Série E.
N° d'ordre : 43.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Nicolas BEZSSONOFF (N. BESSONOW)

DÉLÉGUÉ DANS LES FONCTIONS DE PRÉPARATEUR STAGIAIRE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

1re THÈSE : UN RÉACTIF DES VITAMINES, DES COMPOSÉS A FONCTION ORTHOÉNOLIQUE ET DES BASES AZOTÉES : L'ACIDE MONOMOLYBDO-PHOSPHO-TUNGSTIQUE.

2e THÈSE : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 7 Novembre 1934, devant la Commission d'examen.

MM. Emile TERROINE, *Président.*
L. BOUNOURE... } *Examinateurs.*
R. BONNET..... }

IMPRIMERIE CAMILLE ANDRÉ ET Cie
1, BOULEVARD JEAN-JAURÈS, 1
NANCY

1934

Série E.
N° d'ordre : 43.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Nicolas BEZSSONOFF (N. BESSONOW)

DÉLÉGUÉ DANS LES FONCTIONS DE PRÉPARATEUR STAGIAIRE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

1re **THÈSE** : Un réactif des vitamines, des composés a fonction orthoénolique et des bases azotées : l'acide monomolybdo-phospho-tungstique.

2e **THÈSE** : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 7 Novembre 1934, devant la Commission d'examen.

MM. Emile TERROINE, *Président.*
L. BOUNOURE... } *Examinateurs.*
R. BONNET..... }

IMPRIMERIE CAMILLE ANDRÉ ET Cie
1, Boulevard Jean-Jaurès, 1
NANCY

1934

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Doyen ..... M. E. ROTHE, Professeur de Physique du Globe.

Doyen honoraire ..... M. E. BATAILLON.

Professeurs honoraires .. MM. E. CHATTON, E. ESCLANGON, M. FRECHET, H. GAULT, M. GIGNOUX, L. HACKSPILL, E. DE MARGERIE, G. RIBAUD, E. TOPSENT, H. VILLAT.

Secrétaire ..... M. G. CUVIER.

Professeurs

MM.	
G. VALIRON	Analyse supérieure.
P. WEISS	Physique générale.
H. OLLIVIER	Physique générale.
C. HOUARD	Botanique.
E. TERROINE	Physiologie générale.
J. DE LAPPARENT .	Minéralogie et Pétrographie.
R. THIRY	Mécanique rationnelle.
G. CERF	Calcul différentiel et intégral.
G. DUBOIS	Géologie et Paléontologie.
P. FLAMANT	Mathématiques générales.
E. CORNEC	Chimie générale.
A. DANJON	Astronomie.
P. DE BEAUCHAMP .	Zoologie et Anatomie comparée.
L. BOUNOURE	Biologie générale.
R. ROMANN	Chimie minérale et Chimie physique.
G. FOEX	Physique expérimentale.
N.	Chimie organique.
H. CHERMEZON	Botanique.
G. REMPP	Physique du Globe.
J. LACOSTE	Physique du Globe.
H. WEISS	Physico-Chimie du Pétrole.
G. HUGEL	Chimie du Pétrole.

Maîtres de conférences

MM.	
Ch. STAEHLING	Chimie appliquée.
P. SOLEILLET	Physique mathématique.
R. BONNET	Physique et Chimie biologiques.
A. ROUSSEL	Mathématiques générales.
A. CHRETIEN	Chimie minérale.
J. MARESQUELLE ..	Botanique.
R. HOVASSE	Biologie générale.
P.-A. REMY	Zoologie.
H. CARTAN	Mathématiques.
H. FORESTIER	Chimie.
L. NEEL	Physique générale.
A. WEIL	Mathématiques.
N.	Minéralogie.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MONSIEUR EMILE F. TERROINE

Professeur à la Faculté des Sciences
de STRASBOURG

qui a bien voulu me faire l'honneur

d'accepter la présidence de cette thèse.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548008_0056

UN RÉACTIF DES VITAMINES, DES COMPOSÉS ORTHOÉNOLIQUE ET DES BASES AZOTÉES : l'Acide Monomolybdo-Phospho-Tungstique

INTRODUCTION

Le Mo et le Tu appartiennent l'un à la V^{e}, l'autre à la VI^{e} période de la table de MENDELEEFF. Le numéro atomique du Mo étant 42, celui du Tu, 74, en est fort différent. On ne saurait d'après cela expliquer la similitude frappante de certaines propriétés chimiques de ces éléments. Par contre, elle se justifie pleinement à l'examen de l'ingénieuse représentation du système périodique qu'inspira à Julius THOMSEN le principe de PAULI.

THOMSEN répartit les éléments par période, en colonnes verticales réunissant par un trait ceux de deux colonnes voisines, ayant le même nombre d'électrons dans leurs orbites externes.

Le Mo se trouve ainsi relié au Tu. En effet, d'après le tableau de BOHRSTONER (HAISSINSKY, 1932), les deux couches externes des atomes du Mo et du Tu contiennent le même nombre de 14 électrons. Non moins important

est le fait que la répartition des électrons entre ces couches est sensiblement la même dans les deux cas.

Couches		K	L	M	N	O	P
Nombre d'électrons par couche	Mo	2	8	18	13	1	
	Tu	2	8	18	32	12	2

Les couches périphériques du Mo et du Tu contiennent respectivement 1 et 2 électrons, 13 et 12 électrons étant distribués dans les couches disposées immédiatement au-dessous de la périphérie.

Les propriétés physiques et chimiques, dépendant du nombre des électrons externes, et les couches extérieures du Mo et du Tu se trouvant au même degré de formation, la similitude des propriétés chimiques de ces éléments découle du principe de PAULI.

Le Mo, de même que le Tu, possède la faculté, exceptionnellement développée, de former, en se combinant avec d'autres éléments, des complexes polyatomiques d'un poids moléculaire fort élevé. Ces complexes, à leur tour, entrent facilement en réaction avec des corps chimiques divers. Il en résulte la formation de molécules encore plus volumineuses ou d'agrégats moléculaires. Ces particules, nouvellement formées, peuvent se séparer de la solution, produisant un précipité. Elles peuvent également, restant en suspension, modifier les propriétés optiques de la solution et faire apparaître une réaction colorée typique. Une coloration peut évidemment aussi être engendrée par un groupement chromophore, formé par suite de la réaction du complexe avec le corps éprouvé.

Il convient de souligner dès maintenant l'aptitude particulière du Mo de provoquer une réaction colorée de ce genre. Le Mo sextivalent se réduit facilement, en milieu acide, en Mo pentavalent (BRITTEN et GERMAN, 1930). Or, la présence de ce dernier communique une teinte bleue aux solutions.

La faculté exceptionnelle des complexes Molybdique et Tungstique d'entrer facilement en combinaison avec des substances diverses, provoquant tantôt la formation d'un précipité volumineux, tantôt l'apparition d'une teinte typique, décida dès longtemps de leurs applications en chimie analytique. Ces applications, qui concernent aussi bien le domaine de la chimie minérale et organique, que celui spécial à la biologie, deviennent toujours plus nombreuses et variées. Le progrès en cette matière se relie évidemment à celui de la chimie des complexes polyatomiques du Mo et du Tu.

Une des catégories de ces complexes, la mieux étudiée à ce jour, est représentée par les acides hétéropolymères du Mo et du Tu sextivalent. L'acide monomolybdo-phospho-tungstique, objet de notre étude, appartenant à cette catégorie, nous préciserons les caractères généraux qui la distinguent essentiellement.

Le nombre d'atomes du Mo et du Tu, inclus dans la molécule d'un acide de ce type, peut atteindre 24. Ce nombre indique la somme des atomes des deux éléments, présents dans la même molécule, ou se réfère au Mo ou au Tu, pris isolément. Citons, en guise d'exemple, la composition d'un acide phospho-tungstique obtenu par MALAPRADE (1929) sous forme de son sel sodique:

$$(P^2O^5)\ (Tu\ O^3)\ 24\ (Na^2\ O)^3.$$

Si la structure d'un acide tungstique simple, Tu O^4H^2, peut être considérée comme établie (MORLEY, 1930), celle des acides hétéro-polymères est loin de l'être. On commence à peine à obtenir quelques précisions à ce sujet. Ainsi, d'après PAULING (1929), la structure d'un acide que forme le Mo et aussi le Tu avec Si, s'exprime le mieux par la formule:

$$H^4(SiO^4)\ (Mo\ ou\ Tu)^{12}\ O^{18}(OH)^{36}.$$

D'après SCHWARZ et GIÈSE (1930), le Mo et le Tu, se combinant avec le Ge, donnent des acides du type:

$$H^8\ Ge\ [(Mo\ ou\ Tu)^2\ O^7]^6\ 28\ H^2\ O.$$

En regard aux travaux toujours plus nombreux, consacrés aux acides hétéro-polymères, contenant isolément le Mo ou le Tu, on est surpris de constater le peu d'attention que suscita jusqu'à présent l'étude des acides de ce type contenant à la fois ces deux éléments.

FOLIN eut le premier l'idée d'utiliser, en tant que réactif spécial des phénols, une solution qui contenait en fait un mélange d'acides molybdo-phospho-tungstiques. Le réactif de FOLIN (FOLIN et DENIS, 1912 et 1915) pour les phénols s'obtient en faisant bouillir pendant deux heures le mélange contenant par litre d'eau 100 grammes de tungstate de soude, 20 grammes d'acide phosphomolybdique et 50 cm^3 d'acide phosphorique concentré (à 85°). Employé en présence d'un excès de carbonate de soude, il donne une coloration bleue avec les mono, bi et triphénols et leurs dérivés (exception faite pour les dérivés nitrés).

D'après P. THOMAS (1921), cette même réaction s'obtient avec le scatol et le tryptophane, corps ne possédant aucune fonction phénolique.

D'après GORTNER et HOLM (1920), LEVIN (1920), elle peut encore être obtenue avec un grand nombre de substances organiques variées.

Etant donné la diversité des corps qui, avec le réactif en question, donnent la coloration bleue, sa valeur spécifique pour la détermination de la fonction phénol est négligeable. Tout l'intérêt de cette tentative de FOLIN réside dans l'idée d'un réactif dans lequel seraient conjuguées les propriétés du Mo et du Tu sextivalent, unis au phosphore.

FOLIN a émis l'opinion que, dans son réactif des phénols, le produit réagissant doit être très complexe, aussi il ne fit aucune tentative pour l'isoler.

WU (1920), étudiant la composition des acides phospho-molybdo-tungstiques, s'occupa particulièrement de cette question. Cet auteur distinguait deux groupes principaux parmi ces acides. L'un donnant des cristaux blancs peu solubles dans l'eau, est caractérisé par le rapport $\frac{Tu\ O^3 + Mo\ O^3}{P^2\ O^5} = 24$. L'autre, dont les cristaux jaunes sont très solubles dans l'eau, par le rapport $\frac{Tu\ O^3 + Mo\ O^3}{P^2\ O^5} = 18$.

D'après WU, le corps, donnant, en milieu alcalin, les réactions colorées du réactif des phénols de FOLIN, ap-

partient au second groupe. Pour isoler ce corps, l'auteur fit bouillir pendant huit heures (avec réfrigérant à reflux) 700 cm^3 du réactif des phénols de FOLIN avec 100 cm^3 d'acide chlorhydrique concentré.

Se servant ensuite de chlorure d'ammonium, il obtint un mélange de deux sels ammoniacaux de forme cristalline différente. Les formules données par WU sont les suivantes:

$(NH^4)^2\ O.\ P^2\ O^5.\ 13\ Tu\ O^3\ 5\ Mo\ O^3\ IOH^2O$
et $(NH^4)^2\ O.\ P^2\ O^5.\ 14\ Tu\ O^3\ 4\ Mo\ O^3\ IOH^2O.$

D'après WU, une solution aqueuse de ce mélange donne, en milieu alcalin (excès de carbonate de soude), les réactions colorées caractéristiques du réactif des phénols de FOLIN.

Ainsi WU (1920) ne put en somme obtenir que des mélanges d'acides du type caractérisé par le rapport

$$\frac{(Tu\ O^3)^n + (Mo^3)^m}{P^2\ O^5}\ ;\ n + m = 18.$$

Aucun de ces acides ne fut obtenu par lui isolément.

Un an plus tard, nous réussîmes à préparer (BEZSSONOFF, 1921 (3) l'acide monomolybdo-phospho-tungstique de composition $(Mo\ O^3)\ (Tu\ O^3)^{17}\ (P^2\ O^5)\ 24\ H^2\ O.$ Il appartenait à un type d'acides décrit par WU, mais n'était pas représenté dans les mélanges mentionnés par cet auteur.

En 1925, REIF proposa d'utiliser pour la détermination colorimétrique de l'acide urique, présent dans le

sang et le lait, un réactif phospho-molybdo-tungstique qu'il préparait en mélangeant:

Tungstate de sodium	3,00 gr.
Phosphate de sodium	2,00 »
Acide molybdique	0,05 »
Eau	25,00 »

Le mélange, mis en dissolution par un léger chauffage au bain-marie, est ensuite refroïdi et neutralisé en ajoutant goutte à goutte de l'acide nitrique jusqu'au virage du papier de tournesol.

Pour faire l'épreuve, on ajoutait à 10 cm^3 de la substance éprouvée d'abord 0,5 cm^3 d'acide chlorhydrique à 10 %, et ensuite 1 cm^3 de réactif.

Ensuite, le mélange était chauffé à la flamme jusqu'à l'ébullition et, après cela, laissé à la température ordinaire.

Ce réactif a été utilisé pour la détermination de l'acide urique dans le lait et dans le sang, détermination qui se fondait sur la faculté du réactif de provoquer en présence de l'acide urique une réaction bleue.

Il faut cependant noter que l'affirmation de REIF concernant la spécificité de son réactif vis-à-vis de l'acide urique ne peut être considérée comme démontrée. Une telle démonstration semblait pourtant d'autant plus nécessaire que le réactif de REIF contenait du Mo. Or, le réactif phospho-tungstique de FOLIN (FOLIN et DENIS, 1912, 1915, 1920), bien que destiné au même but de dosage de l'acide urique dans le sang, ne conserve sa spécificité qu'à condition d'être exempt de toute trace de Mo (FOLIN, 1930).

D'après son mode de préparation, le réactif de REIF devait contenir des acides molybdo-phospho-tungstiques. Toutefois, l'auteur ne donne aucune précision concernant la nature chimique du principe réagissant. Son réactif doit donc être considéré comme un mélange indéterminé.

Les acides molybdo-phospho-tungstiques furent également étudiés dans un but d'application industrielle par RABE, WENK et HARTMANN (brevet 1928; voir aussi J.-G. FARBEN, *Industrie Brevets* 1926, 1929) en vue de préparation d'un colorant par réduction de ces acides. Le texte sommaire des brevets ne mentionne que des formules schématiques se rapportant aux deux types d'acides, dont l'existence fut déjà indiquée par WU:

$$3\ H^2O\ .\ P^2O^5\ [(Mo\ O^3)^n + (Tu\ O^3)^m]\ ;\ n + m = 24$$
et $$3\ H^2O\ .\ P^2O^5\ [(Mo\ O^3)^{n'} + (Tu\ O^3)^{m'}]\ ;\ n' + m' = 18.$$

Ainsi qu'on a pu le voir, les seuls renseignements précis qu'on possède sur la nature chimique des composés, qui contiennent simultanément le Mo et le Tu sextivalent et l'acide ortho-phosphorique, sont fournis par le travail de WU (1920) et mes recherches personnelles (BEZSSONOFF, 1921 (3), 1922, 1926). Le seul acide de ce type, obtenu isolément, paraît être l'acide monomolybdo-phospho-tungstique.

CHAPITRE PREMIER

LES PRINCIPAUX CARACTERES DE L'ACIDE MONOMOLYBDO-PHOSPHO-TUNGSTIQUE

SON OBTENTION ET SA COMPOSITION ELEMENTAIRE

Travaillant en 1919 auprès de mon défunt Maître, le grand savant norvégien AXEL HOLST, à des recherches consacrées à la vitamine C, j'ai pu apercevoir une certaine correspondance entre l'intensité de la coloration bleue provoquée par un liquide antiscorbutique en présence du réactif des phénols de FOLIN et la teneur du liquide en vitamine C. Cette correspondance ne se manifestait toutefois que sporadiquement, souvent même les indications ainsi obtenues se révélèrent juste contraires à celles qu'aurait dû fournir une réaction spécifique de la vitamine C.

Aussi j'ai pensé à obtenir, en modifiant radicalement le réactif FOLIN, un autre réactif qui serait spécifique pour la vitamine C. D'après WU (1920), la facilité avec laquelle les acides phospho-molybdo-tungstiques provoquent la réaction bleu-violette se trouve proportionnée avec leur teneur en Mo. D'autre part, WU constata que cette teneur augmente à mesure qu'on hausse la température et renforce l'acidité de la solution dans laquelle se forment ces acides.

M'inspirant de ces indications, j'ai cherché à obtenir un acide du même type que ceux représentés dans le

mélange de FOLIN, mais qui contiendrait la moindre quantité possible de Mo, autrement dit un seul atome de cet élément. Il paraissait avantageux de pouvoir conserver à côté du Tu le Mo, vu la faculté très particulière de ce dernier de provoquer une réaction violette; faculté expliquée actuellement par la formation du Mo pentavalent, correspondant à un degré d'oxydation inconnu pour le Tu.

D'autre part, la teneur minime de l'acide en Mo devait contribuer à la sélectivité des réactions colorées que cet acide serait susceptible de donner.

Après maints efforts, le résultat cherché fut obtenu pour la première fois en opérant de la façon suivante (BEZSSONOFF, 1921 (3) et 1922) : 44 grammes de tungstate de soude et 2,7 grammes d'acide phospho-molybdique furent dissous dans 400 cm^3 d'eau distillée. On introduit ensuite dans cette solution 5 cm^3 d'acide orthophosphorique concentré à 85 % et 5 cm^3 d'acide sulfurique cinq fois normal. Evaporant ce mélange au bain-marie, à une température qui ne dépassait pas 40° C., j'ai constaté la formation de cristaux jaune pâle, monocliniques, uniformes. Le corps qui cristallisait dans ces conditions n'était autre que l'acide monomolybdo-phospho-tungstique.

L'analyse fut faite sur le produit deux fois recristallisé dans l'eau distillée, puis lavé rapidement à l'alcool et séché jusqu'à poids constant, entre deux feuilles de papier à filtre. Ainsi obtenus, les cristaux contenaient des traces négligeables d'acide sulfurique.

Tout autre moyen de dessication, rapide ou lent, dans le vide ou à la pression atmosphérique, en présence d'anhydride phosphorique, ou encore à l'étuve à 200°, semblait agir sur le produit; on obtenait des cristaux verdâtres qui, dans l'eau, donnaient une solution nettement trouble.

Pendant la dessication, on peut noter comme perte de poids 3,95 % en moyenne; 4,1 % à l'étuve; 3,8 % en présence d'anhydride phosphorique.

Procédant à l'analyse du produit, on détermina successivement le phosphore, le tungstène et le molybdène.

Le phosphore fut précipité sous forme de phosphate ammoniaco-magnésien. Pour obtenir le tungstène, la liqueur filtrée, évaporée à sec au bain-marie, fut traitée par l'acide sulfurique. Après cette opération, on précipita le molybdène, en milieu acide, par l'hydrogène sulfuré.

De plus, un dosage du molybdène a été fait, toujours par précipitation à l'hydrogène sulfuré, mais directement dans la solution acide du produit.

La moyenne des résultats de quatre analyses est la suivante:

$P^2 O^5$	2,95 %
$Mo O^3$	3,01 %
$Tu O^3$	83,60 %

Si l'on compare les teneurs en divers composants calculées d'après la formule

$$[(Mo\ O^3)\ (Tu\ O^3)^{17} + (P^2\ O^5)] + 24\ H^2\ O$$

et obtenues à l'analyse:

Composants	Données théoriques calculées d'après la formule $(Mo^3)\ (TuO^3)^{17}\ (P^2\ O^5)\ 24\ H^2O$	Données analytiques déterminées directement
P^2O^5	3,05 p. 100	2,95 p. 100
$Mo\ O^3$	3,09 —	3,01 —
$Tu\ O^3$	83,99 —	83.60 —

Le départ facile de l'eau de cristallisation ne permettant qu'une dessication imparfaite des cristaux, une erreur en moins affecte la teneur des trois composants.

L'acide isolé appartenait donc au type des acides phospho-molybdo-tungstiques isolé par WU et caractérisé par le rapport

$$\frac{Tu\ O^3 + Mo\ O^3}{P^2\ O^5} = 18.$$

L'acide se distingue par une teneur minima en $Mo\ O^3$ (1 Mo pour 17 Tu). Les deux acides présents d'après WU dans le mélange de FOLIN sont beaucoup plus riches en cet élément (4 Mo pour 14 Tu et 5 Mo pour 13 Tu). Pour les obtenir, WU employa l'ébullition prolongée et une

forte concentration en acide, ce qui expliquerait leur teneur en Mo.

Une autre conclusion de cet auteur s'est trouvée aussi confirmée. WU indiqua que la réduction (coloration bleu-violet) s'obtient d'autant plus difficilement que la proportion de Mo dans les acides phospho-molybdo-tungstiques est plus faible.

L'expérimentation ne tarda pas à révéler que de nombreux composés, qui provoquaient la réaction violette en présence du réactif FOLIN, n'en produisaient aucune avec le nouveau réactif, l'acide monomolybdo-phospho-tungstique.

Ce dernier, qui nous désignerons, pour abréger, réactif B, peut être obtenu rapidement et en état de grande pureté par un procédé autre que celui déjà mentionné et que nous allons indiquer plus loin.

Solubilité et propriétés acides

Le réactif B est soluble dans l'alcool absolu à la température de 20° C. en toutes proportions et sa solubilité dans l'eau dépasse 80 %. Insoluble dans l'éther de pétrole et le benzène, il se décompose au contact de l'éther éthylique. Les acides SO^4H^2, ClH, NO^3H, amenés à une concentration voisine de 6 N, déterminent la précipitation du réactif B à l'état cristallin. Cependant, sa solubilité dans leurs solutions normales est grande; dans le cas de l'acide sulfurique, elle dépasse 45 % à la température de 15° C. Utilisant ces propriétés, il est facile d'obtenir la substance à l'état pur (BEZSSONOFF, 1926). On éprouve la pureté des cristaux en ajoutant quelques gouttes de leur solution aqueuse à 2 ou 3 cm^3 de pyrogallol à 1 %. La réaction colorée doit être jaune-brun et se conserver telle deux heures au moins.

La formation des composés complexes

Les propriétés acides du réactif B sont bien exprimées. Le pH de sa solution N 10^{-3} est d'environ de 2,2 et N 10^{-2} de pH 0,9. La titration avec la soude indique qu'il possède aux confins de la zone acide (pH 5,6) 12 oxhydriles dissociés.

Les ions NH^4 et K, en dilution ne dépassant pas N/40 et en milieu acide, provoquent avec le réactif la formation d'un précipité blanc amorphe, complexe moléculaire insoluble dans l'eau chaude, soluble dans l'alcali. Le ion Na ne possède pas cette faculté dont font preuve le ion $Pb^{\cdot\cdot}$ et le ion $Ba^{\cdot\cdot}$, ce dernier en solution neutre.

La présence des ions Ca et Mg ne provoque pas la formation d'un précipité avec le réactif B. Le $Na^{\cdot}$, $K^{\cdot}$, $N\,H^{\cdot}_4$ et $Mg^{\cdot\cdot}$ furent éprouvés sous forme de chlorures ou de sulfates, d'acétates et de citrates. Le Ca et Ba sous forme de chlorure et le Pb en tant qu'acétate. Nos observations ne permirent pas de déceler l'influence de l'anion sur la marche du phénomène.

Il est curieux de constater que la faculté d'un cation de précipiter le réactif B est, dans certaines limites, fonction de la longueur de son rayon ionique. On peut s'en convaincre à l'examen des chiffres ci-dessous, obtenus par GOLDSCHMIDT et PAULING [HAISSINSKY (1932)] :

Rayon ionique en 10^{-8} cm	1,33	1,43	1,43	1,32	0,98	0,78	1,06
Cation	K	NH^4	Ba	Pl	Na	Mg	Ca
Action sur le réactif B...	précipitent				neprécipit.pas		

D'après ces chiffres, seuls les cations qui possèdent un rayon ionique égal ou supérieur à $1{,}32.10^{-8}$ cent.

forment avec le réactif B un complexe insoluble. Ceci s'accorde bien avec la théorie de la formation des complexes de KOSSEL (1928). KOSSEL indique que le travail nécessaire pour arracher un ion est d'autant plus grand que la charge de l'ion est plus élevée et son volume atomique plus petit. Dans notre cas particulier, les charges du Na' et K' étant sensiblement égales, leur volume atomique diffère de beaucoup, le rayon ionique du premier étant 0,98 et celui du deuxième 1,33. Le Na se trouve donc beaucoup plus étroitement lié, dans le sens précis du terme, à son anion que le K. Aussi l'acide monomolybdo-phospho-tungstique, dont la charge est incomplète, attire le Na et le K, mais ne réussit à fixer que ce dernier. Précédemment, nous avons laissé entendre que l'interdépendance entre la faculté des cations de former des complexes insolubles avec le réactif B et la grandeur de leur rayon ionique ne se manifeste que dans certaines limites. Nous allons maintenant préciser la signification de cette réserve.

Les complexes que forment avec le réactif B les sels des cations alcalins K et NH_4 se distinguent par une grande stabilité. Les précipités correspondants, traités à la température de 60° C. par des solutions normales d'acides minéraux, ne cèdent ni l'ammoniaque, ni la potasse. Recourant à l'action combinée des acides fortement concentrés et du chauffage, on n'arrive à libérer le K et le NH_4 qu'après avoir décomposé le noyau phospho-molybdo-tungstique. Il est possible de séparer l'ammoniaque par distillation de la solution alcaline du complexe, mais ce traitement a pour effet de dénaturer le réactif B. On arrive cependant à libérer tempérairement des traces d'acide monomolybdo-phospho-tungsti-

que, présent dans ces complexes, par le procédé suivant: le précipité ammoniacal ou potassique est dissous dans une solution de soude caustique à 1 %. La solution incolore est additionnée, volume à volume, d'une solution de $SO_4 H_2$ à 40 % volumétrique, portée à la température de 60° C. Il se forme de suite un précipité, mais la coloration légèrement jaune du liquide surnageant et les réactions colorées typiques qu'il provoque caractérisent la présence du réactif B libre. La solution, laissée au repos, se décolore rapidement et perd la faculté de provoquer les réactions colorées.

Le comportement des sels de Ba", en particulier du $Ba Cl_2$, vis-à-vis du réactif B, se distingue déjà assez nettement de celui des sels potassiques et ammoniacaux. Le complexe insoluble ne s'obtient qu'en petite quantité tant que la réaction du milieu est au-dessous de pH 6. Le pH favorable à sa formation est voisin de 7. Traité par des solutions demi-normales des acides ClH et $SO_4 H_2$ à la température de 60° C., le précipité ainsi obtenu se dissout et libère l'acide monomolybdo-phospho-tungstique. Ceci est attesté par les réactions colorées propres à cet acide, ainsi par exemple, par la réaction violette qui apparaît en présence de l'hydroquinol et du pyrocatéchol.

Quand on traite le même précipité par une solution de sulfate de soude à 10 %, portée à la température de 60° C., passent en solution des traces d'un corps autre que l'acide monomolybdo-phospho-tungstique. En effet, le liquide, séparé du précipité et convenablement acidulé, provoque bien avec l'hydroquinol une réaction violette, mais celle donnée par le pyrocatéchol est orange tirant sur le grenat. Le corps qui les provoque doit être une

impureté qui accompagne l'acide monomolybdo-phospho-tungstique. Des considérations diverses me conduisent à penser que cette impureté est une substance proche de l'acide phospho-tungstique de MALAPRADE (1929) $P_2 O_5 (Tu O_3)_{24}$, $3R_2O$, sinon cet acide lui-même.

Le réactif B précipite en présence d'acétate de plomb, en milieu acidifié, par l'acide acétique. Le précipité est facilement décomposé par les acides minéraux dilués, avec libération du réactif.

Le rayon ionique de Au+ étant égal à 1,37 10^{-8} cm., il était intéressant d'établir comment se comporte vis-à-vis du réactif B un sel d'or. Une solution de $Au Cl_3$, éprouvée en milieu acide, neutre et alcalin, ne provoqua aucune formation de précipité en présence du réactif B.

Ainsi, à mesure qu'on s'éloigne du groupe des métaux alcalins, le caractère du composé complexe que revêtent les combinaisons avec les éléments de rayon ionique 1,32, devient toujours moins accusé et finit par disparaître.

Ces dernières constatations ne contredisent nullement la théorie de KOSSEL. En effet, KOSSEL prévoit, hormis la grandeur du rayon ionique, l'influence sur la formation des complexes des facteurs tels que la charge électrostatique et la structure électronique de l'atome. Ces facteurs se modifient considérablement quand on passe des métaux alcalins au Pl et à l'Au.

Parmi tous ces complexes, nous avons étudié avec le plus d'attention celui que forme le réactif avec les sels ammoniacaux. Ceci en vue d'applications possibles dans le domaine des recherches biologiques. Il paraissait tentant de disposer d'un moyen de dosage de l'ammoniaque qui exclut le traitement à l'alcali du liquide éprouvé et permet d'éliminer l'ammoniaque sous sa forme saline.

En outre, on pouvait théoriquement prévoir que les bases azotées autres que l'ammoniaque sont également précipitables par le réactif B.

Les épreuves, faites avec des solutions aqueuses de sels d'alcaloïdes divers, groupe de la quinine et de la morphine, confirmèrent ces prévisions. L'étude des composés que forme un sel ammoniacal avec le réactif B devait fournir les premières indications sur la constitution possible de ce genre de complexes.

Cette étude donna lieu à deux séries d'épreuves. Au cours des épreuves de la première série, on introduisait le réactif en grand excès, cherchant à éliminer le plus complètement possible l'azote ammoniacal présent dans la solution. Les épreuves de la deuxième série avaient pour but d'obtenir le complexe insoluble le plus riche en ammoniaque. On a fait, en outre, varier la teneur en ce sel du mélange réagissant pour établir si la concentration absolue du sel influait sur la composition du précipité. Toutes les expériences ont été faites en utilisant le sulfate d'ammoniaque $SO_4\ (NH_4)_2$ purissimum de MERCK. La solution du réactif B, employé au cours des épreuves de la première série, contenait par litre 600 grammes d'acide monomolybdo-phospho-tungstique et 50 cm^3 de $SO_4\ H_2$ concentré. Pour les épreuves de la deuxième série, on utilisa une solution dont la teneur en acide monomolybdo-phospho-tungstique était quatre fois moindre, celle en $SO_4\ H_2$ restait la même que précédemment. L'azote était dosé au microkjeldal sur des prises de 100 milligrammes de précipité ou 5 cm^3 de filtrat. Les précipités, lavés à l'eau distillée, jusqu'à disparition complète de l'ion SO_4 dans les eaux de lavage, étaient desséchés à poids constant sous pression réduite à 10 millimè-

tres de mercure, à la température de 30° C., en présence de SO_4 Cu.

La première série d'épreuves aboutit aux résultats suivants :

10 cm³ d'une solution de SO_4 $(NH_4)_2$ à 1 %, additionnés de 5 cm³ de réactif B, donnaient un précipité d'une teneur en azote de 1,097 %. Cette teneur correspond à celle du complexe : 1 molécule de réactif B + 4 molécules de SO_4 (NH_4) H et qui est exactement de 1,093 %. Le P. M. du réactif B = 4662 ; celui de 4 molécules de SO_4 (NH_4) H = 4 × 115 = 460. Le P. M. du complexe est donc : 4662 + 460 = 5122. Il contient 4 atomes d'azote : 4 × 14 = 56. Cette teneur exprimée en % = 5600 : 5122 = 1,093 %.

Pour toute autre combinaison du réactif B avec SO_4 (NH_4) H, SO_4 $(NH_4)_2$ ou NH_4, le calcul ne donne aucune teneur en azote proche du chiffre obtenu à l'analyse. La composition du composé complexe, obtenu dans ces conditions, serait donc :

$[MoO_3\ (TuO_3)_{17}.\ P_2O_5]\ [(H_2O)_{24}]\ [SO_4\ (NH_4)\ H]_4$.

Pour savoir en quelle proportion l'azote, présent dans la solution initiale, se trouve entraîné dans le précipité, j'ai commencé par déterminer le poids total de ce dernier. Pour cela, 5 cm³ de la solution étaient traités par le réactif et le précipité obtenu séparé par filtre Gooch, garni d'amiante et taré. Lavé et séché, comme indiqué précédemment, le précipité pesait 1,2320 gramme. Le précipité correspondant à 10 cm³ de la solution ammoniacale devait peser le double, soit 2,2640 grammes.

La teneur du précipité en azote, déterminée expérimentalement, égalait 1,097 %. Celle calculée d'après la composition atomique du complexe devant correspondre

à 1,093 %. Déterminée d'après le chiffre expérimental, la quantité d'azote, contenue dans le précipité, était donc de 24,8361 milligrames, soit 99,3 % de la teneur en azote du liquide initial. Calculée d'après le chiffre théorique, la teneur en azote du précipité se révèle égale à 98,58 % de l'azote contenu dans la solution initiale. Pour contrôler ces données, j'ai recouru à des dosages de l'azote restant dans le filtrat.

Sur les 25 milligrammes d'azote que contenait la solution ammoniacale avant l'addition du réactif, on retrouve dans le filtrat, après précipitation, 0,43 milligramme d'azote, soit 1,72 %. Le précipité renfermerait donc 98,28 % de l'azote présent dans la solution initiale. Par conséquent, on doit admettre qu'environ 98,5 % de l'azote, présent dans la solution initiale, est précipité dans ces conditions par le réactif B.

Les épreuves de la deuxième série furent également exécutées en introduisant dans 10 cm^3 de la solution ammoniacale 5 cm^3 de réactif B. Mais, cette fois, la solution du réactif ne contenait que 150 grammes d'acide monomolybdo-phospho-tungstique par litre et la teneur en $SO_4 (NH_4)_2$ des solutions éprouvées était variable.

Les résultats sont résumés ci-dessous :

Teneur en p. cent	$SO_4 (NH_4)_2$ dans la solution éprouvée	1	2	4	10
	L'azote dans le précipité	1,28	1,35	1,31	1,31

La teneur moyenne en azote des précipités obtenus dans ces conditions égale donc 1,31 %. Celle, calculée pour le complexe : 1 molécule de réactif B + 5 molécules

de SO_4 $(NH_4)H$ est de 1,33 %. Ce chiffre correspond de près à celui trouvé par analyse.

Le calcul de la teneur en azote de tout autre complexe susceptible de se former dans ces conditions donne des valeurs fort éloignées de celle trouvée expérimentalement.

Par conséquent, quand SO_4 $(NH_4)_2$ se trouve en excès par rapport au réactif, le précipité qui se forme possède la composition suivante:

$$[MoO_3\ (TuO_3)_{17}.\ P_2O_5]\ [(H_2O)_{24}]\ [SO_4\ NH_4)\ H]_5.$$

La teneur en azote des précipités qui se forment en solution, dont le dosage en SO_4 $(NH_4)_2$ varie de 1 à 10 %, s'avère, dans les limites de l'erreur expérimentale, être la même. D'ailleurs, la valence 5 correspond à la valence maximum qui s'observe dans la formation d'un complexe.

Ainsi, quand on opère en présence d'un excès de réactif B, le composé insoluble obtenu contient la base azotée, SO_4 $(NH_4)H$ en proportion de 4 molécules pour une molécule de réactif. Quand on modifie la composition du mélange réagissant, introduisant en excès non pas le réactif, mais le sel ammoniacal, le précipité qui se forme contient juste une molécule de SO_4 $(NH_4)H$ en plus, soit 5 molécules de sel ammoniacal.

Le potentiel des solutions du réactif B (l'acide monomolybdo-phospho-tungstique) et du dichlorphénol-indophénol (1)

La première série des mesures est due à M. Reiss. Il a déterminé le potentiel qui s'établit après mélange des solutions du réactif B, 2 NIO^{-3}, et d'hydroquinol, 4 NIO^{-2}. Les solutions furent amenées au pH voulu par addition de SO^4H^2 et d'acétate de soude. On opérait en présence d'air; sur 10 cm^3 de la solution du réactif B à laquelle on ajoutait de 1 à 3 cm^3 de la solution d'hydroquinol. Le rH^2 des solutions au 2-6 dichlorphénol-indophénol fut calculé par M. Reiss d'après les données de Clark, recourant à une extrapolation dans le cas de la solution p H 2.

Les chiffres obtenus par M. Reiss

Dichlorphénol-indophénol	pH 2, rH^2 23,8	pH 5,6, rH^2 22,7
Réactif B + Hydroquinol	23,8	22,8
Réaction violette	+	0

Nos propres mesures furent faites en conditions suivantes: Le réactif B fut éprouvé *sans lui ajouter l'hydroquinol.* Nous avons déterminé le potentiel de la solution du 2-6 dichlorphénol-indophénol opérant de même que dans le cas du réactif, en présence de l'air. Les concentrations choisies correspondaient à celles réalisées

(1) Nous comparons les potentiels des solutions du réactif B et du dichlorphénol-indophénol vu que ces deux composés sont employés pour la détection de la vitamine C.

communément au cours des dosages et titrations. Le tampon utilisé était une solution de phosphate de soude et d'acide phosphorique ajustée au pH 3,5.

Voici les résultats obtenus:

Réactif B concentration $5NIO^{-5}$ potentiel 506 m. v. rH^2 24,5

Dichlorphénol-indophénol $2ONIO^{-5}$ potentiel 498 m. v. rH^2 24,2

Evalué par mesure de la force électromotrice, le pouvoir réducteur du réactif B et du dichlorphénol-indophénol s'avère donc être sensiblement le même.

LES REACTIONS COLOREES DE L'ACIDE MONOMOLYBDO-PHOSPHO-TUNGSTIQUE (le réactif B) EN MILIEU AQUEUX ET ACIDE

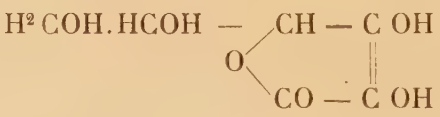
Les solutions dans l'eau et l'alcool éthylique du réactif B sont jaune pâle. Amenées à un pH 5,6, elles deviennent incolores et cessent de provoquer les réactions colorées typiques. Ces dernières ne se manifestent avec pleine intensité que quand le mélange réagissant possède un pH 5 à pH 2. D'autre part, elles ne se produisent pas en une solution alcoolique dont la teneur en eau est moindre de 40 % en poids. Pour qu'elles puissent se manifester, la présence de la forme non dissociée du réactif et celle de molécules d'eau non liées est également nécessaire.

Parmi les réactions colorées de l'acide monomolybdophospho-tungstique, on distingue les trois types principaux suivants:

1° La réaction diénolique.

Coloration bleu-violette qui se produit en présence de l'acide ascorbique, du réductone, de l'o- et p-diphénol et de certains de leurs dérivés. *a*) La teinte bleu-violet est la seule qui apparaisse. *b*) Elle atteint son intensité limite quand une molécule du réducteur se trouve en présence de trois molécules du réactif, ce dernier ajouté en excès ne faisant que le diluer (précision des mesures $\pm$ 5 %). *c*) La coloration est stable.

Le fait que la vitamine C provoque la réaction diénolique s'accorde parfaitement avec la structure de ce composé qui doit être figurée comme suit:



Cette structure qui comprend une fonction diénolique fut proposée pour la première fois par Hirst (1933). Son exactitude fut définitivement prouvée par Hirst, Parcival et Smith (1933), Micheel et Kraft (1933) (1), (2), (3), (4) et Euler et Klussmann 1933). Reichstein, auquel on doit la synthèse de la vitamine C, a reconnu actuellement que cette façon de figurer la structure de la vitamine C est la seule correcte (Reichstein et Grussner, 1934).

Nous avons éprouvé au réactif B les échantillons suivants d'acide ascorbique pur:

1° Poudre blanche, microcristalline, préparée par Micheel à partir du suc d'orange;

2° Poudre microcristalline, légèrement teintée en jaune, isolée par SZENT-GYORGYI du suc de poivron ou paprika (Capsicum) ;

3° Acide ascorbique synthétique, acide gauche identique à la vitamine C naturelle :

a) poudre microcristalline blanche, préparée personnellement par REICHSTEIN ;

b) beaux cristaux incolores, préparés industriellement d'après le procédé de REICHSTEIN ;

c) préparation commerciale présentée sous forme de pastilles formées par un mélange d'acide ascorbique (obtenu d'après REICHSTEIN) et de mannose.

L'intensité de la réaction violette des solutions d'acide ascorbique fut mesurée en prenant comme unité la teinte que provoque le réactif B dans une solution IO^{-5} N d'hydroquinol. Nous désignons cette unité par le symbole (U. H.).

1. *Premier échantillon* (MICHEEL). — L'intensité de la réaction violette, mesurée en différentes dilutions, variait dans les limites de 3,00 à 2,84 (U. H.) pour une teneur en substance de 0,602 mg. dans 100 cm^3. La moyenne de 8 mesures était égale à 2,96 (U. H.). D'après la relation équimoléculaire, ce nombre de 2,96 (U. H.) devait correspondre à 0,527 mg. en acide ascorbique pur. L'échantillon contenait donc *apparemment* 100 . 527 : 602 = 87,3 % de son poids en vitamine C pure.

2. *Deuxième échantillon* (SZENT-GYORGYI). — La teneur en acide ascorbique pur, déterminée comme précédemment, se révéla égale à 85,7 %.

3. *Troisième échantillon a), b) et c) (vitamine synthétique).* — Les moyennes des déterminations des spécimens *a)* et *b)* accusèrent une teneur apparente en vitamine pure de 87,9 et 88,0 %. En ce qui concerne le spécimen *c)*, dans 5 pastilles la teneur apparente en acide ascorbique fut trouvée égale à 88,0 % par rapport à la teneur indiquée. Dans deux autres pastilles, on constata un abaissement notable de la teneur en réducteur diénolique. Leur teneur apparente se révéla voisine de 70 %.

Ainsi qu'on a pu le voir, l'épreuve comparative des solutions d'hydroquinol et d'acide ascorbique établit que ces dernières donnent une coloration violette dont l'intensité est d'environ 12 % moindre que celle qui correspondrait strictement avec le rapport équimoléculaire des deux composés. La différnece est un peu plus notable dans le cas de l'acide ascorbique préparé par SZENT-GYORGYI. Remarquons cependant que la teinte jaunâtre de cet échantillon accuse la présence d'une impureté. En effet, le Docteur REICHSTEIN a eu l'amabilité de me communiquer, dans une de ses lettres, qu'il a pu, recourant à des recristallisations de l'échantillon SZENT-GYORGYI, le débarrasser entièrement de toute teinte jaunâtre sans lui faire perdre aucune de ses propriétés.

Les faits qui viennent d'être exposés permettent déjà de conclure que l'intensité de la coloration violette, provoquée par une molécule de vitamine C, est inférieure de 12 % à celle que produit une molécule d'hydroquinol. Les données obtenues en opérant avec le jus de citron (citrus med. var. lim.) confirment cette conclusion. On sait que le jus extrait d'un citron mûr, en un parfait état de conservation, se distingue par la constance de sa

teneur en vitamine C. Elle serait voisine de 0,63 mg. par 1 cm^3 de jus, d'après les résultats des meilleures expériences faites en administrant aux cobayes parallèlement l'acide ascorbique pur et le jus de citron. Or, l'intensité de la réaction violette que provoque le jus de citron se révèle, à de rares exceptions près, égale à 320 (U. H.). Ce chiffre indique une teneur apparente de vitamine C dans le jus de citron qui serait de: 176 gr. 320. IO^{-5} = 0,5612 mg. Elle est nettement inférieure à celle déduite des résultats donnés par le test biologique. Cependant, en la corrigeant de 12 % en plus, on obtient: 0,5612 . 112: 100 = 0,6285 mg. ou 0,63 mg., un chiffre qui correspond exactement à celui qui se base sur les données des épreuves sur cobayes.

Aussi pour le dosage colorimétrique de la vitamine C, nous avons adopté une unité colorimétrique qui correspond à une teinte violette, dont l'intensité est de 10 % moindre que celle provoquée par une solution strictement IO^{-5} N d'hydroquinol. Elle égale celle que provoque, en présence du réactif B, 1/10.000e de mg. d'hydroquinol dissous dans 1 cm^3 d'eau. Cette unité est désignée par le symbole U. H.

2° La réaction du pyrogallol (O-triphénol).

a) Teinte brun-jaune. *b*) Son intensité est au maximum quand une molécule du triphénol réagit avec 1,2 à 1,3 molécule du réactif. Ce dernier, ajouté en excès, ne provoque aucun changement de la coloration. *c*) La coloration vire au bleu-violet après plusieurs heures ou des jours, suivant la pureté du réactif utilisé.

3° La réaction du tanin.

D'après Glassmann et Posdeew (1929), le réactif B donnerait aussi avec les tanins la réaction bleu-violette. Ceci est inexact. La réaction diénolique type diffère essentiellement de celle donnée par les tanins qui accompagnent communément dans les milieux naturels la vitamine et ses dérivés. Cette dernière étant provoquée par le tanin officinal, nous l'appellerons « réaction du tanin ». La première coloration que provoque le réactif en présence du tanin est jaune-brun (Bezssonoff (1), 1925). Mais, introduit en excès, il la fait virer au mauve, superposition du jaune-brun et du violet. Si l'on continue à ajouter le réactif, la teinte mauve s'intensifie et ensuite passe au bleu-violet pur. Opérant avec du tanin (1) préparé d'après le Codex, nous avons déterminé les proportions tanin-réactif correspondant aux divers changements de la teinte. Le réactif fut toujours introduit dans 10 cm^3 d'une solution de tanin se trouvant au pH 3,5. Une évaluation approximative des rapports moléculaires que représentent les proportionnalités observées a permis de dégager l'allure générale du phénomène.

Sans vouloir discuter ici le problème complexe de la composition exacte du tanin, nous avons admis, d'accord avec la fiche d'analyse, que notre échantillon contenait 90 % d'acide digallique (C^{14}, H^{10} O^9). Le poids moléculaire de cet acide étant 322 et du réactif 4662, les rapports moléculaires mentionnés ci-dessous furent calculés sur cette base.

---

(1) Tanin à l'alcool pour analyse Rhône-Poulenc.

Tanin officinal en mg.	Réactif en mg.		Coloration	
	utilisé	calculé : 1 molécule de réactif pour 3 mol. d'ac. digal.	immédiate	après 15'
1,25	5 / 10	5,3	jaune / mauve	trace mauve / mauve
1,75	5 / 10	7,5	jaune / trace mauve	jaune / mauve
2,00	5 / 10	8,5	jaune / trace mauve	jaune / mauve
2,50	5 / 10	10,7	jaune / jaune	jaune / trace mauve

Ainsi le virage du jaune au mauve commence quand le réactif est introduit en proportion de 1 molécule sur 3 molécules d'acide digallique. Des épreuves du même genre ont permis de constater que le mauve vire au bleu-violet pur quand le réactif est introduit en quantité relativement neuf fois plus grande, soit 3 molécules du réactif pour 1 molécule d'acide digallique. Mais l'intensité de la coloration bleu-violette n'atteint son maximum que quand le rapport se rapproche de la proportion 9 molécules de réactif pour 1 molécule d'acide digallique.

Les données précitées furent établies en expérimentant avec des solutions de tanin à $2,5.IO^{-5}$ et $1,25.IO^{-5}$ et en se servant de l'hydroquinol comme étalon. L'intensité maximum de la coloration violette s'obtenait avec 30 à 35 mg. de réactif dans le premier cas, et 15 à 20 mg. dans le second, les quantités indiquées par le calcul étant 32 et 16 mg.

Observées séparément, la réaction diénolique et celle du tanin s'avèrent différentes, mais conservent-elles leur indépendance en se produisant simultanément dans le même milieu?

On a fait réagir séparément 2,5 mg. de réactif avec 1,75 mg. de tanin et avec 0,55 mg. d'hydroquinol, d'une part, et, d'autre part, 5 mg. de réactif avec des quantités correspondantes des deux produits mélangés. Les trois solutions se trouvaient au même volume de 10 cm^3. Superposant les tubes des réactions séparées, on obtient la même nuance et intensité que celle du tube contenant le mélange, adossé à un tube rempli d'eau. L'épreuve fut répétée et son résultat confirmé, en opérant avec 0,350 mg. de tanin et 0,055 mg. d'hydroquinol pris séparément et en mélange et 5 et 10 mg. de réactif, le volume de chaque solution étant 10 cm^3.

Ainsi les deux réactions peuvent se produire indépendamment dans le même liquide. Mais comment s'opère la répartition du réactif entre les deux réducteurs? Il se fixe d'abord sur celui qui provoque la réaction diénolique type ne produisant avec le tanin que la réaction jaune. Ceci s'observe même quand la quantité du réactif introduite dans le mélange est plus que suffisante pour obtenir le virage au mauve du tanin expérimenté séparément.

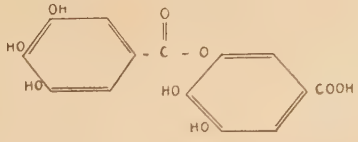
Exemple: le mélange de 10 mg. d'hydroquinol + 0,7 mg. de tanin + 5 mg. de réactif donne une coloration violette teintée de mauve égale à celle qu'on obtient en superposant la teinte violette produite par 10 mg. d'hydroquinol + 5 mg. de réactif et la teinte jaune pâle due à 0,7 mg. de tanin + 1,25 mg. de réactif. Le réactif ne doit pas se trouver toutefois en grand excès par rapport à la totalité des deux composants du mélange.

Il reste à signaler un moyen permettant de reconnaître la réaction du tanin quand elle apparaît en des solutions très diluées, la teinte étant difficile à distinguer. Les virages du jaune au mauve et du mauve au violet qui caractérisent cette réaction s'accompagnent d'un renforcement notable de la couleur. Or, ces virages se produisent quand la concentration du réactif, étant la même, celle du tanin décroît. Ainsi, en diluant deux et quatre fois une solution de tanin au 1/10.000e et en ajoutant par 5 mg. de réactif à 10 cm^3 de chacune des solutions, on constate que plus la dilution est grande, plus forte est la teinte. Ce phénomène très caractéristique n'est jamais provoqué par un réducteur donnant la réaction diénolique type.

La spécificité de la réaction diénolique type

L'ensemble des réactions colorées désigné ici sous le terme « la réaction du tanin » s'accorde avec la structure de l'acide digallique:

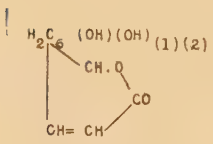
Acide digallique



La présence simultanée de fonctions tri- et diénolique (ou orthodiphénolique) justifie aussi bien l'apparition de la teinte jaune que de la violette. Cependant, dans les milieux biologiques, on rencontre également des composés qui, possédant une fonction diénolique et privés de fonction triénolique, devraient, semble-t-il, provoquer la réaction diénolique type. Or, ce cas est exceptionnel. L'influence de différents groupements autres que la fonction triénolique suffit aussi à faire précéder d'une teinte jaune la teinte violette et peut même éliminer complètement cette dernière.

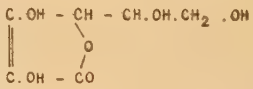
Cette influence est conditionnée par la nature du groupe interférant et sa position stéréométrique. Comparons les structures de l'esculétol, principe isolé et caractérisé par Gabriel BERTRAND et M^lle^ DJORITCH (G. BERTRAND et DJORITCH, 1924; DJORITCH, 1924) et de la vitamine C.

Esculétol



Réaction jaune-mauve

Vitamine C



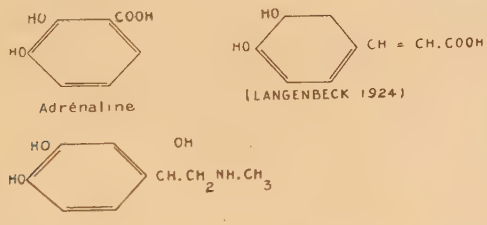
Réaction bleu-violet

L'échantillon d'esculétol aimablement donné à nous par M^lle^ DJORITCH en 1924 provoquait, en tant que réaction principale, une coloration jaune-mauve; la coloration était jaune-brun franc quand le réactif était ajouté soit en très faible quantité, soit en grand excès.

L'acide protocatéchique donne la réaction jaune-brun du pyrogallol, l'acide caféique une réaction jaune-brun, et l'adrénaline une réaction rose-brun qui vira au violet avec excès de réactif.

Acide protocatéchique *Acide caféique*

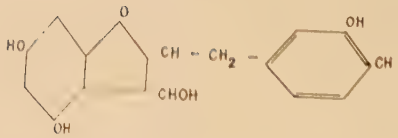
Adrénaline



Hormis cette réaction, l'adrénaline se distingue par la faiblesse inattendue de son pouvoir décolorant vis-à-vis du dichlorphénol-indophénol.

La catéchine provoque la réaction diénolique type, ce qui s'accorde avec les particularités de sa structure étudiée par FREUDENBERG (1923). La présence dans les milieux naturels de ce polyphénol sous sa forme non combinée paraît exceptionnelle.

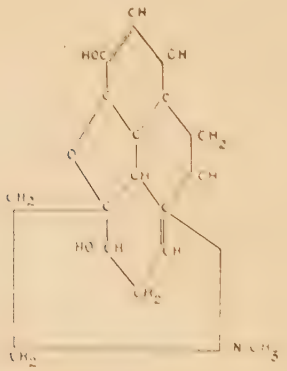
Catéchine



Enfin, le quinhydrol provoque la coloration bleu-violet, mais son intensité est deux fois moindre que celle engendrée par l'hydroquinol lui-même.

Ainsi, comme on a pu le voir, la coloration jaune-brun est provoquée par des groupements à fonction éthylénique très diverse. Aux exemples déjà cités, joignons celui de la morphine qui donne cette coloration accompagnée d'un abondant précipité blanc.

Morphine (STEINER, 1924)



SUBSTANCES	REACTION COLOREE
Vitamine C (acide ascorbique) $C_6H_8O_6$	
Le reductone CHOH:CHOH.CH_2O	
Pyrocatéchol $C_6H_6O_2$	bleu-violet
Hydroquinol $C_6H_6O_2$	stable
Quinhydrol $C_6H_6O_2 + C_6H_4O_2$	
Catéchine $C_{15}H_{14}O_6$	
Pyrogallol $C_6H_6O_3$	brun-jaune stable
Gaiacol $C_7H_8O_2$	orange
Acide caféique $C_9H_8O_4$	jaune
Morphine $C_{17}H_{19}N\ O_3$	brun-jaune- précipité blanc
Tanin (acide digallique) $C_{14}H_{10}O_9$	brun-jaune, vire au mauve ensuite au violet avec excès de réactif
Acide protocatéchique $C_7H_6O_4$	
Esculétol $C_{10}H_8O_4$	
Adrénaline $C_9H_{13}N\ O_3$	rose-brun, vire au violet avec excès de réactif

Substances ne donnant aucune réaction colorée: *la cystéine*, l'acide phénique (le monophénol), l'acide salicylique, la tyrosine, la résorcine, l'orcine, la phloroglucine, l'acide urique, l'urée, les hexoses, les alcools allylique, méthylique et éthylique, le glycérol, le formol, l'acétal, l'acétone, etc...

CHAPITRE DEUXIEME

LES DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT L'EPREUVE AU REACTIF B DES PRODUITS ANTISCORBUTIQUES

RESUME DES TRAVAUX DE DIFFERENTS AUTEURS CONSACRES A CE SUJET

Avant d'exposer les recherches faites par d'autres auteurs, nous commencerons par résumer brièvement nos premières publications sur la réaction violette en tant qu'indice de la vitamine C (BEZSSONOFF, 1921 (1), (2), (3) et 1922).

La technique que nous avons utilisée alors consistait à diluer à moitié par de l'eau distillée le liquide biologique destiné à l'épreuve, ajoutant ensuite à 2 cm^3 de la solution 5 gouttes de réactif B, ces opérations étant faites à la température ordinaire.

Le réactif étant constitué par une solution aqueuse, contenant 15 % d'acide monomolybdo-phospho-tungstique et 5 % volumétriques d'acide sulfurique. Cinq gouttes de cette solution devaient contenir environ 50 mg. de réactif cristallin.

Bien que rudimentaire, cette technique, par un hasard heureux, permit d'éviter en majeure partie les er-

reurs qui se produisent quand le réactif est introduit en trop grand excès par rapport à la substance éprouvée. Rappelons que l'excès du réactif, ainsi que nous l'avons indiqué au chapitre premier, détermine le virage au violet de la réaction jaune-brun des tanins. Les épreuves de différentes substances, privées d'action antiscorbutique, mais riches en polyphénols, tels par exemple les extraits aqueux de graines non germées, le bouillon de culture d'un microbe, nous permirent de constater l'absence de toute réaction violette. Une de ces épreuves fut particulièrement démonstrative. Il était déjà alors établi par HESS et UNGER (1918) que la prune présente une véritable anomalie parmi les fruits par l'absence du pouvoir antiscorbutique. Or, le suc extrait des prunes donnait, au lieu de la réaction violette, une réaction jaune-brun, nettement différente. Cependant, la pêche, qui appartient au même genre que la prune, provoquait avec intensité la réaction violette. La présence de la vitamine C dans la pêche était inconnue à l'époque. Elle ne tarda pas à être démontrée par les épreuves sur cobayes de DELF (1922).

Non moins significatifs furent les résultats obtenus en expérimentant avec le suc extrait des pommes de terre. Le suc qui se sépare de la pomme de terre, broyée à la presse, brunit rapidement au contact de l'air atmosphérique. De même que son action antiscorbutique, la réaction violette qu'il provoque est très faible. En saupoudrant la pomme de terre de cristaux d'acide tartrique ou citrique, on extrayait un suc clair qui donnait une réaction violette bien marquée et possédait une activité antiscorbutique considérable. Le suc extrait de pomme de terre, non acidifié, traité après coup par addition

d'acide, recouvrait sa teinte claire initiale, mais non la faculté de donner la réaction violette.

Les sucs de chou et d'orange, dont la richesse en vitamine C était bien établie, donnaient une réaction violette intense.

La conservation et l'ébullition en présence d'air du suc de chou, le chauffage à l'autoclave à 120° C. pendant 30 minutes, du suc d'orange supprimaient entièrement ou en grande partie leur faculté de donner la réaction violette. Des expériences, faites sur cobayes, démontraient que les mêmes traitements conduisaient à une destruction correspondante de la vitamine C. D'autre part, un chauffage à l'autoclave du suc d'orange, durant le même laps de temps, mais à la température de 105° C., n'influait notablement ni sur l'intensité de la réaction violette, ni sur l'activité antiscorbutique du suc.

L'ensemble de ces données constituait un faisceau de preuves tendant à démontrer que la réaction violette a pour cause la molécule de la vitamine C elle-même.

Supposant que la réaction s'adresse non à la vitamine, mais à une substance qui l'accompagne, on devait admettre que ce corps hypothétique:

1° Est absent dans les milieux biologiques les plus complexes (extraits de graines et bouillons de culture) quand ceux-ci sont dépourvus de vitamine C;

2° Fait défaut dans la prune, de même que la vitamine, et réapparaît avec cette dernière dans la pêche;

3° Est détruit parallèlement à la vitamine à la température ordinaire par l'action des oxydases de la pomme de terre;

4° Disparaît avec la vitamine sous l'effet de l'ébullition à l'air ou du chauffage à 120° C. à l'autoclave;

5° Résiste de même que la vitamine au chauffage à 105° C.

Supposer une telle coïncidence entre les propriétés d'un corps hypothétique et celles de la vitamine, admettant en plus que ce corps accompagne aussi fidèlement la vitamine dans tous les cas cités, constituait une hypothèse peu défendable. Dès cette époque, j'ai donc pu conclure que la réaction violette est bien un indice propre de la vitamine C. Ainsi que nous y avons insisté au début de ce chapitre, cela n'impliquait aucunement que la réaction est strictement spécifique par rapport à la vitamine. D'ailleurs, dans mes premières publications, à côté des données qui viennent d'être citées, j'en produisais également d'autres qui s'opposaient à admettre la spécificité absolue de ce test colorimétrique.

Ainsi, tout en constatant qu'une ébullition prolongée du suc de chou acidulé supprime sa faculté de donner la réaction violette, j'ai noté qu'une ébullition d'une minute a un effet juste opposé. On remarquait dans ce cas une augmentation considérable de l'intensité de la réaction et pourtant l'ébullition à l'air ne pouvait que diminuer la teneur du suc en vitamine C active.

D'autre part, il fut constaté dans certains cas un désaccord entre les teneurs respectives en vitamine C de sucs végétaux, indiquées par épreuve colorimétrique et par expérience sur cobayes. Ce désaccord pouvait atteindre 40 % ; il dépassait donc nettement l'approximation du test sur cobayes.

Une explication rationnelle des causes qui déterminent les contradictions entre les tests colorimétrique et biologique ne fut acquise qu'après l'identification définitive de la vitamine C. Alors seulement nous apparut la

possibilité d'élaborer une méthode suffisamment sûre d'un dosage de ce principe, fondé sur l'emploi du réactif B (BEZSSONOFF et DELIRE, 1933 (1), (2), BEZSSONOFF et VAN WIEN, 1934 (1), BEZSSONOFF, 1934).

Cependant, au cours des années qui suivirent nos premières publications, différents auteurs se sont livrés à des recherches sur l'application du réactif B au dosage de la vitamine C présente dans les milieux naturels. Compte tenu des erreurs techniques manifestes, ces recherches apportèrent néanmoins une récolte abondante de faits expérimentaux mettant bien en relief le genre de difficultés que rencontre l'application directe du réactif B au dosage de la vitamine active. La connaissance de ces travaux est nécessaire pour pouvoir juger en quelle mesure notre technique actuelle réussit à surmonter ces difficultés. Nous allons donc maintenant résumer les données et conclusions contenues dans ces publications, en nous tenant aussi près que possible de leur texte original.

KAY et ZILVA (1923) commencent par déclarer qu'ils ont expérimenté avec une grande quantité de substances, recourant simultanément à l'épreuve sur cobaye et au réactif B. Ces recherches les ont conduit à conclure que, s'il existe une certaine corrélation entre la réaction violette et l'action antiscorbutique de certaines substances, le rapport du test biologique et colorimétrique ne se confirme pas dans tous les cas. D'une part, ils ont pu constater que quelques substances antiscorbutiques actives ne donnaient pas la réaction colorée et, d'autre part, des substances inactives produisaient la coloration en question. L'épreuve au réactif B a été appliquée par eux principalement à différentes préparations isolées par des

moyens chimiques. Ces préparations furent simultanément dosées sur animaux.

Les auteurs se sont convaincus que la majorité des substances actives donne une coloration de différente intensité, mais qu'il n'existe pas de relation quantitative entre les deux épreuves colorimétrique et biologique et qu'il était même possible d'obtenir une substance active ne donnant pas de coloration avec le réactif B. Soumettant à diverses manipulations le jus de citron frais, ils ont pu, en effet, obtenir un produit qui conservait une certaine action antiscorbutique, mais ne provoquait aucune réaction violette dans la grande majorité des cas. Celle qui fut exceptionnellement observée était très faible.

D'autre part, les auteurs ont observé l'apparition de la coloration violette, provoquée par des substances telles que la levure qui est privée d'action antiscorbutique. La levure, lavée au préalable, était ensuite desséchée pendant 60 heures à 37°. La levure sèche fut digérée pendant trois heures avec de l'eau (dix fois environ son poids) et centrifugée. Après addition de 6 gouttes de réactif à 2 cm^3 de cet extrait, il se produisait immédiatement une coloration bleue avec formation d'un précipité. Après 10 minutes de contact avec le réactif, ce précipité était centrifugé; la solution obtenue était bleu pâle.

Les auteurs concluent en se basent sur l'ensemble de leurs observations que le réactif B ne présente aucune utilité pour la recherche de la vitamine C. Ils font remarquer que le fait qu'un grand nombre de substances antiscorbutiques donnent la réaction violette n'est pas une preuve de la spécificité du réactif.

Cependant, les auteurs estiment nécessaire de signaler que la substance, qui donne la réaction bleu-violette avec le réactif B, est détruite par oxydation parallèlement à la vitamine. Ils citent à l'appui les expériences suivantes: le jus de citron décitraté, chauffé à 100° C., dans une atmosphère de gaz carbonique, donne la réaction, tandis que le même jus, chauffé à l'air, ne la donne pas. De même le jus de citron, amené à une alcalinité égale à N/20 et exposé ensuite à l'air pendant deux heures à la température de laboratoire ne donne plus la coloration.

Rappelant les expériences publiées récemment par l'un d'eux (ZILVA, 1922, 1923), les auteurs constatent que le corps qui provoque la réaction violette se conduit dans tous ces cas de même que la vitamine C active.

Après avoir pris connaissance du travail de KAY et ZILVA, j'ai entrepris de vérifier leurs données concernant la réaction violette de l'extrait de levure [BEZSSONOFF, 1924 (1)]. J'ai préparé l'extrait de levure suivant exactement les indications données par KAY et ZILVA, néanmoins cet extrait provoquait après addition du réactif, non pas la réaction violette, mais une faible réaction jaune.

Revenant par la suite sur cette question, ZILVA affirma à nouveau, très brièvement d'ailleurs, que l'extrait de levure lui a donné la coloration violette.

WEDGEWOOD et FORD (1924) ayant reçu un envoi de jus de choucroute constatèrent que ce jus donne avec intensité la réaction bleu-violette de BEZSSONOFF. Aussi ils décidèrent de doser l'activité antiscorbutique de ce jus par épreuves sur cobayes. Le jus de choucroute, employé dans ces expériences, était un liquide clair,

légèrement verdâtre; il contenait une bonne proportion de sels et il avait une réaction acide. C'était le jus obtenu par pression de choux salés, coupés en lanières et subissant l'autolyse. Il n'était pas désagréable au goût si on ne le chauffait pas. Il a été conservé sur la glace dès sa réception et jusqu'à son emploi. Des cobayes soumis à un régime scorbutigène furent contraints à absorber une dose journalière de ce jus variant de 5 cm^3 à 0,5 cm^3. Les résultats obtenus fournirent aux auteurs les conclusions suivantes:

Bien que le jus de choucroute donne une forte coloration bleu-violette avec le réactif B en solution acide, il ne protège pas le cobaye du scorbut. On doit en conclure que le jus de choucroute ne contient pas de substance antiscorbutique ou n'en contient qu'une quantité infime. Il s'ensuit que, si le réactif de BEZSSONOFF peut servir pour indiquer la présence de la vitamine C, ce n'est pas un indicateur infaillible.

KOOPMANN (1924) commence par indiquer que si on n'a pas beaucoup d'assistants à sa disposition, la recherche des vitamines est très difficile. Pour cette raison, toute méthode qui simplifie la détermination des vitamines mérite de l'intérêt. Aussi KOOPMANN estime qu'il serait très important de posséder une méthode simple qui permettrait de mesurer la vitamine antiscorbutique.

Ces considérations ont décidé KOOPMANN à étudier l'application de la réaction, proposée par BEZSSONOFF, au dosage de la vitamine C. Il procéda à l'épreuve de différents produits naturels, comparant les résultats du test colorimétrique avec ceux, obtenus à l'aide des expériences sur animaux.

KOOPMANN utilisa comme réactif une solution qui

contenait 7,5 gr. d'acide monomolybdo-phospho-tungstique, dissous dans 100 cm^3 d'une solution d'acide sulfurique à 5 % volumétrique. Il ajoutait 5 gouttes de ce réactif à 2 cm^3 d'une solution obtenue en diluant à moitié le liquide destiné à l'épreuve.

KOOPMANN a représenté les résultats de ses observations au moyen d'un tableau que nous reproduisons ici. Il a porté sur ce tableau ses estimations colorimétriques de la teneur d'un aliment en vitamine C et aussi celles obtenues par épreuves sur cobayes. Les indications qui se rapportent au test biologique furent empruntées en majeure partie aux recherches de HESS. Les produits, sur la valeur antiscorbutique desquels KOOPMANN manquait de renseignements, sont marqués par un astérisque. L'estimation colorimétrique est exprimée par KOOPMANN de la façon suivante:

Forte coloration bleu-violette, apparaissant immédiatement . . . . . ****

Forte coloration bleu-violette se produisant graduellement . . . . . ***

Coloration bleu-violette moyenne . . . . . **

Faible coloration . . . . . *

Réaction douteuse . . . . . ?

Aliments	Vitamine C Réaction violette	Vitamine C Expérience sur cobaye
Viande maigre	*	*
Foie	?	*
Jus de viande	*	*
Lait de vache, cru	—	*
Crême	—	*
Lait condensé	—	*
Lait cuit	—	*

Aliments	Vitamine C Réaction violette	Vitamine C Expérience sur cobaye
*Lait pasteurisé	—	*
Lait de beurre	—	—
Œufs frais	—	—
Farine	—	—
Riz glacé	—	—
Pois sec	—	—
Haricot sec	—	—
Pois germé	****	***
Chou frais	***	**
Chou cuit	*	*
Salade crue	***	*
*Carotte fraîche	**	*
Carotte cuite	—	
Betterave	- -	*
Pomme de terre crue	***	beaucoup (Berg, p. 259)
Pomme de terre cuite	**	suffisant Berg
Ognon	***	**
Jus de citron frais	****	***
Jus de citron conservé	****	**
Jus d'orange	****	***
*Fraise	*	
Framboise	**	**
Groseille verte	—	
Pêche	**	**
		Delf. Lancet 1922
*Prune	—	—
*Cerise	**	
*Ananas frais	?	
*Ananas conservé	—	
Banane	—	très peu
Abricot	—	
Tomate fraîche	***	***

GIVENS et MAX, *Journ. Bioch. Chem.*, V, 37, p. 259.

Bière	—	—
*Huile d'olive	—	—
*Lard	—	—
Beurre	—	—
Saindoux	—	—
Sang	?	?

D'après KOOPMANN, ce tableau montre que les deux méthodes donnent des résultats très concordants. Il est étonné cependant par le fait que le lait constitue une exception. KOOPMANN fait observer que depuis les recherches de CHICK, HUME et SKELTON, il n'y a plus de doute possible concernant la présence de la vitamine C dans le lait. Il en déduit que la méthode chimique est un peu moins sensible. Néanmoins, il considère que cette méthode mérite un intérêt particulier et c'est là la conclusion générale de son travail.

LŒWY (1925) expérimenta avec différents sucs et extraits en ajoutant 5 gouttes de réactif B (solution à 15 %) à 1 cm^3 de la solution éprouvée. Il résume comme suit les résultats de ses observations :

Les substances sûrement privées de vitamine C (alcool, éther, bière, vinaigre, sel, sucre) n'ont jamais donné de coloration violette. Se rappelant que KAY et ZILVA ont signalé qu'ils avaient obtenu une réaction positive avec une préparation de levure, LŒWY a examiné une série de levures et des préparations extraites de la levure et aussi des spécialités de son (HEVITON, NEUGAREN, ORYPAN) ; ils ont tous donné une réaction négative. L'épreuve avec le lait et le petit-lait n'a pas donné de résultat. LŒWY remarque que la réaction toujours négative semble être influencée plutôt par les propriétés physico-chimiques du milieu que par l'absence du facteur C. LŒWY résume ses observations comme suit :

La réaction n'a jamais été négative avec des substances connues pour leur haute teneur en vitamine. Même la coloration propre des substances empêchait à peine la réaction. Chez les betteraves, par exemple, on voyait se former un précipité, constitué par d'épais flocons bleu

foncé après addition du réactif. Il n'y a que les choux rouges qui font exception : la coloration bleue spontanée du jus changeait immédiatement en rouge après addition d'acide, et en vert après addition d'alcali.

LŒWY fut frappé par le fait que le jus de groseilles vertes devenait nettement violet et celui de groseilles mûres ne donnait que faiblement cette réaction. Il a pu aussi constater que l'addition de H^2 O^2 ou de potasse caustique au jus de citron empêchait la coloration bleu-violette de se produire. La réaction du suc des légumes riches en vitamine C, comme le chou-rave, le chou blanc, était affaiblie par deux heures de cuisson. Tandis que le jus de citron et le jus de tomate donnaient encore une réaction après huit jours de repos à l'air, on n'obtenait plus de réaction avec le jus de chou âgé de deux jours.

LŒWY aboutit à la conclusion suivante :

La réaction colorée, proposée par BEZSSONOFF, d'exécution rapide et facile, coïncide, sauf de rares exceptions, avec les données obtenues par les expériences sur animaux et par les observations cliniques. La réaction avec le lait est négative par suite d'une propriété physico-chimique particulière à ce milieu. L'intensité de la réaction colorée paraît correspondre, selon toute apparence, à la teneur réelle des produits en facteur C.

FRANK (1925), se rendant compte de l'intérêt que présente la possibilité d'utiliser une réaction chimique pour la recherche de la vitamine C, a décidé de vérifier les données contradictoires, publiées au sujet de la réaction de BEZSSONOFF par KAY et ZILVA et par KOOPMANN. Au cours de ses recherches, FRANK a utilisé simultanément la solution du réactif B, qui fut indiquée dans les premières publications de BEZSSONOFF, et celle proposée

par KOOPMANN. La première (solution B) contient 15 gr. et la deuxième (solution K) 7,5 gr. d'acide monomolybdo-phospho-tungstique, dissous dans les deux cas dans 100 cm^3 d'acide sulfurique dilué (5 % volumétrique).

FRANK étudia différents laits et jus de viande, de légumes et de fruits. Le lait fut examiné tel que. En ce qui concerne les autres produits, FRANK exprimait le suc qui était immédiatement filtré et éprouvé au réactif. FRANK note que la réaction n'est pas applicable dans le cas des jus possédant une coloration propre, comme par exemple le suc de betterave, de chou rouge, de chou de Bruxelles, d'épinard, de salade et de viande. L'auteur fait la remarque que, de ce fait, la valeur de la réaction se trouve limitée. Il note, en outre, que son utilité pratique est amoindrie quand les jus eux-mêmes possèdent une légère teinte bleuâtre. Dans ce cas, seulement un contrôle fait avec de l'acide sulfurique dilué, lui permettait de certifier l'absence de la réaction.

Le tableau qui suit résume les observations faites par FRANK. Les annotations, réaction violette B et K, qui figurent sur ce tableau, signifient respectivement que l'épreuve a été faite utilisant la solution de réactif B, primitivement indiquée par BEZSSONOFF et celle, deux fois plus diluée, proposée par KOOPMANN.

Aliment ou jus exprimé	Réaction violette		Test sur cobaye
	B	K	
Lait fraîchement trait	—	—	*
Lait de marché	—	—	*
Lait de chèvre	—	—	—
Lait de femme	* ?	* ?	*
Jus de viande	—	—	0
Jus d'orange I (orange sanguine)	*	*	?
Jus d'orange II	**	*	****
Jus de citron I	**	**	****
Jus de citron II cru	**	*	****
Jus de citron II cuit	*	*	—
Jus de citron III cru	**	**	****
Jus de citron III cuit	—	—	—
Jus de raisin	**	**	*
Jus de pomme	* ?	* ?	*
Jus de poire	—	—	—
Banane	**	**	*
Chou blanc I	**	**	***
Chou blanc II cru	**	**	****
Chou blanc II cuit	**	*	*
Chou rouge	—	—	?
Choucroute	***	***	0
Suc de pomme de terre	***	**	***
Suc de pomme de terre II cru	*	*	***
Suc de pomme de terre II cuit	—	—	0
Chou-rave	***	*	?
Chou-fleur	* ?	* ?	?
Chou de Bruxelles	—	—	?
Betterave	* ?	* ?	?
Navet	* ?	* ?	?
Salsifis	—	—	?
Céleri	—	—	?
Carotte	* ?	* ?	**
Tomate	*	*	***
Ognon	* ?	* ?	—
Epinard	* ?	* ?	?
Laitue	—	—	—
Rhubarbe	*	*	**

De ses observations, FRANK tire les conclusions suivantes :

Les jus exprimés qui se montrent biologiquement très actifs donnent aussi ordinairement une coloration bleu-violette intense (jus de citron, jus d'orange, jus de pomme de terre, jus de chou). Par exception, le suc de tomate, qui est très riche en vitamine C, a donné une réaction faible. FRANK note ensuite avec surprise la faiblesse de la réaction violette provoquée par le suc de carotte. Remarquons à ce sujet que la carotte fut longtemps estimée être un antiscorbutique puissant. Mais nous savons maintenant que, riche en vitamine A, elle ne possède qu'une très faible teneur en vitamine C et, par conséquent, l'appréciation colorimétrique de FRANK fut dans ce cas correcte. Continuant ses commentaires, FRANK remarque que la réaction violette apparaît généralement en tant que faible ou négative dans les sucs extraits d'aliments dont la teneur en vitamine C, dosée sur cobaye, s'est révélée faible ou douteuse. Il note cependant qu'à cet égard, les résultats qu'il a observés ne furent pas toujours concordants.

Ainsi FRANK a observé dans certains cas une réaction violette d'intensité moyenne, provoquée par des produits (banane, jus de raisin) dont la teneur en vitamine C, prouvée biologiquement, est faible. Il suppose que cela est dû probablement à ce que la teneur de ces aliments en vitamine antiscorbutique est variable et que ceux examinés par lui étaient plus riches en vitamine C que ceux éprouvés sur animaux. A l'appui de ces considérations, FRANK cite des données parues dans la littérature qui témoignent des variations notables de la teneur en vitamine C de différents végétaux qui s'observent

suivant l'année de la récolte ou la variété du végétal.

Nous reconnaissons que le désaccord, signalé par FRANK, entre les résultats de ses mesures colorimétriques et les données obtenues par épreuve sur cobaye, peut en partie être attribué à de telles variations. Cela d'autant plus que, dans la majeure partie des cas, FRANK compare ses mesures colorimétriques avec les résultats obtenue par des épreuves sur animaux, faites par d'autres auteurs. Néanmoins, il nous paraît évident que la cause principale du désaccord réside dans ce cas dans les imperfections de la technique rudimentaire de l'épreuve colorimétrique.

FRANK note, en outre, que dans le jus de pomme de terre, extrait en présence d'acide, il a observé une forte réaction. La cuisson détruisait le corps qui donnait la réaction. Le jus de citron, additionné d'alcali, mais encore acide, donnait une faible réaction; par contre, le jus de citron traité par l'alcali en excès ne donnait plus de réaction. FRANK remarque que les résultats concordaient avec ceux obtenus par épreuves sur animaux. FRANK constate que le jus de choucroute donne une réaction bleu-violette nette. Il attire aussi l'attention sur le fait que, dans les différents échantillons de lait, à l'exception du lait de femme, il a constaté, de même que KOOPMANN, une réaction négative. Cependant, tous les laits éprouvés sur animaux, le lait de chèvre et le lait de femme exceptés, se sont montrés contenant de la vitamine C.

FRANK termine son travail par la conclusion générale suivante:

La réaction de BEZSSONOFF ne concorde pas toujours avec les résultats obtenus par épreuve sur animaux. Elle

est fortement limitée dans son application; seulement une coloration bleu-violette intense indique sûrement la présence de la vitamine C. Dans les cas où elle est moins forte ou douteuse, elle doit être interprétée avec prudence.

MERJANIAN (1926) commence par rappeler les résultats publiés par KOOPMANN concernant la concordance entre les dosages de la vitamine C, faits à l'aide du réactif B et par épreuves sur animaux. D'après lui, ces résultats témoignent d'une concordance presque parfaite entre les deux tests. Aussi l'auteur a tenu à contrôler les données publiées par KOOPMANN. Il confirme ces données à un seul détail près. KOOPMANN n'a pu distinguer l'apparition de la réaction violette dans le lait, bien que cet aliment contient normalement une faible quantité de vitamine C. MERJANIAN réussit à observer une coloration bleu-violette pâle provoquée dans le lait par addition du réactif B. Il remarque, à ce propos, que la teneur en vitamine du lait dépend de la nourriture des vaches et les résultats obtenus pouvaient varier suivant cette nourriture. Il importe de noter que MERJANIAN, ayant éprouvé au réactif B des extraits aqueux de levures de vin, put se convaincre que ces extraits ne provoquaient aucune réaction violette. MERJANIAN signale que le réactif préparé par lui au mois d'août a perdu son action après deux semaines; par contre, le réactif préparé au mois de novembre est resté actif pendant deux mois et demi.

GLASSMANN et POSDEEW (1929) utilisèrent une technique qui diffère essentiellement de celle indiquée par BEZSSONOFF. Leur méthode de dosage peut être résumée comme suit:

1-5 gr. ou 1-5 cm^3 de la substance éprouvée sont dis-

sous dans 50-100 cm³ d'eau. 10 cm³ de cette solution sont additionnés de 2 cm³ de réactif B (à 15 %), le mélange est chauffé dans un tube pendant une heure au bain-marie, ensuite refroidi, ramené avec de l'eau au volume de 12 cm³, filtré et comparé colorimétriquement avec une solution étalon qui correspondait à une certaine concentration d'une solution de jus de citron.

Dans la majorité des cas, les auteurs ont utilisé comme étalon une solution diluée d'hydroquinol (1 cm³ contenant 0,1 mgr. d'hydroquinol), à laquelle ils ajoutaient le réactif B. La constance de la solution étalon était contrôlée colorimétriquement. Ils déterminaient le titre de cette solution, c'est-à-dire la quantité de jus de citron qui donnait avec le réactif B une coloration de la même intensité que la solution étalon. La solution étalon était en outre contrôlée par comparaison à un mélange de matières colorantes, préparé expressément. Ce mélange était composé de 5 cm³ d'une solution (A) de couleur citron 342 de la marque Oskar Mielenz à Lübeck (2,16 mg. dans 1 cm³) + 5 cm³ d'une solution (B) de couleur cerise 159 de marque J. Giebel et Cie à Dresde (0,76 mg. dans 1 cm³) + 5 cm³ d'une solution (C) de violet de méthyle Grubler (0,64 mg. dans 1 cm³) + 35 cm³ d'eau. La solution des matières colorantes comparée à la solution étalon d'hydroquinol a donné le rapport suivant:

Hauteur du colorimètre en m/m

Solution d'hydroquinol + réactif B : Solution de matières colorantes

$$\text{rapport} \frac{\text{solution d'hydroquinol } 7}{\text{solution de matières colorantes } 4{,}1} = \frac{7}{4{,}1} = 1{,}70{,}8$$

Les auteurs recouraient à des mesures directes contre la solution étalon seulement dans les cas où les solutions à éprouver étaient incolores ou presque; s'il fallait examiner des solutions colorées, ils ajoutaient à la solution étalon une certaine quantité d'une matière colorante appropriée, obtenant une coloration qui correspondait à la couleur propre de la solution étudiée avant l'addition du réactif.

La méthode décrite pour le dosage de la vitamine C a été éprouvée en premier lieu sur du jus de citron. On a préparé des solutions de jus de citron, provenant de trois citrons d'origine différente. Le jus a été exprimé et filtré, 5 cm^3 du filtrat ont été dilués dans l'eau jusqu'à 50 cm^3. 10 cm^3 de cette solution diluée ont été additionnés de 2 cm^3 de réactif B, chauffés pendant une heure au bain-marie, après refroidissement ramenés avec de l'eau à 12 cm^3 et mesurés au colorimètre. Les trois solutions de jus de citron, comparées colorimétriquement entre elles, ont donné les résultats exposés dans le tableau suivant. Le citron I fut comparé séparément au citron II et au citron III.

Hauteur du colorimètre en $^m/_m$			
Citron I	Citron II	Citron I	Citron III
15	15,37	20	20,8
10	10,33	15	15,5
		10	10,9

On voit, d'après ce tableau, que les valeurs colorimétriques des trois solutions de jus de citron sont pareilles. Ce fait décida les auteurs à choisir la teneur en vita-

mine C du jus de citron comme unité = 100, pour pouvoir lui comparer les examens faits sur d'autres produits.

Les auteurs font remarquer que les résultats de comparaison entre les épreuves sur animaux et la réaction de BEZSSONOFF, qu'on trouve dans la littérature, sont tantôt concordants, tantôt contradictoires. Eux-mêmes ont pu constater que si, d'après DELF (1920), le rapport entre la teneur en vitamine C du jus de chou et du jus d'orange est d'après le test biologique = 1,5, mesuré colorimétriquement par les auteurs il devient = 0,66.

D'après DEVY (1921), ce rapport entre le jus de pomme de terre et le jus d'orange est biologiquement = 4,66 et colorimétriquement = 3.

Les auteurs ont ensuite procédé à des séries de mesures de l'intensité de la réaction violette provoquée par les solutions 1) des sucs de végétaux antiscorbutiques, 2) des vins et des liqueurs, 3) des sirops de fruits, 4) des extraits aqueux de purée de fruits et de légumes et de confitures, 5) d'extraits de macaroni et de biscuits. Quand il s'agissait d'une substance solide ou pâteuse, on la macérait dans de l'eau de façon à obtenir un extrait, dont 1 cm^3 correspondait à 1 gr. de substance. L'extrait était ensuite dilué 50 fois et filtré. L'épreuve colorimétrique était faite en ajoutant à 10 cm^3 de filtrat 2 cm^3 de réactif B à 15 % et recourant ensuite à un chauffage du mélange au bain-marie durant une heure. Autrement dit, les auteurs utilisaient le réactif B en très grand excès et renforçait encore l'influence due à l'excès du réactif par l'effet du chauffage. Opérant ainsi, ils constatèrent l'apparition de la réaction violette dans tous les liquides qu'ils éprouvaient. L'intensité de cette réaction ne correspondait aucunement à la teneur en vitamine C,

dosée dans ces mêmes substances par épreuve sur cobaye. Ainsi, par exemple, ils trouvent pour un extrait de prunes une valeur colorimétrique exprimée par 3476, celle qu'ils déterminent pour le suc d'orange n'étant que de 264. Or, la richesse en vitamine C de l'orange étant bien connue, celle de la prune, prouvée sur cobaye, s'est avérée pratiquement nulle.

Aussi les résultats de leurs expériences ont amené GLASSMANN et POSEEW à la conclusion que la réaction de BEZSSONOFF ne peut servir à la détermination de la vitamine C. Il ne leur échappe pas, cependant, que leur conclusion se trouve en désaccord avec celle d'autres auteurs tels que KOOPMANN, LŒWY, FRANK et ZACH. Pour expliquer ce désaccord, ils recourent aux considérations suivantes :

D'après les observations de GLASSMANN et POSDEEW, les tanins, à la température ordinaire, et les hydrates de carbone, au cours du chauffage, donnent la même réaction avec le réactif B que le jus de citron. Ainsi 12 cm^3 d'une solution aqueuse de 3 mg. d'hydroquinol et 11,6 cm^3 d'une solution de 0,5 mg. de tanin (KAHLBAUM) donnent, après addition de 6 gouttes de réactif B à 15 % et après chauffage pendant 10 minutes au bain-marie. la même coloration.

Ainsi qu'on peut le voir, les auteurs font par conséquent réagir à chaud 0,5 mg. de tanin avec 60 mg. d'acide monomolybdo-phospho-tungstique. La même quantité de tanin, additionnée à température ordinaire d'une quantité dix fois moindre de réactif, aurait produit une réaction jaune-brun, nettement différente de la réaction violette constatée par GLASSMANN et POSDEEW. Ayant estimé que l'apparition d'une coloration violette

est la réaction typique des tanins mis en présence du réactif B, GLASSMANN et POSDEEW en tirent les conclusions suivantes: « Vu que les tanins sont très répandus dans le règne végétal — ils se trouvent, comme produits normaux du métabolisme des plantes, dans l'écorce, dans les fibres de bois, dans les racines, dans les feuilles et dans les fruits — il n'est pas étonnant que quelques auteurs aient trouvé un certain parallélisme entre les données fournies par le procédé de BEZSSONOFF et les expériences sur animaux concernant la teneur en vitamine C ».

GLASSMANN et POSDEEW supposent, en outre, qu'il existe encore une autre cause de la non spécificité de la réaction violette. Cette réaction étant provoquée en présence d'acide urique par le réactif de REIF, qui contient les mêmes éléments que le réactif B, ils en concluent que le réactif B doit également la provoquer dans le même cas. Or, le réactif de REIF est non un acide phospho-molybdo-tungstique, comme le désignent GLASSMANN et POSDEEW, mais un mélange de tungstate de soude et d'acide phospho-molybdique. Ce mélange contient des individus chimiques qui n'ont jamais été identifiés et dont les propriétés restent inconnues. Le réactif B, convenablement purifié, ne provoque aucune réaction colorée en présence d'acide urique.

REMY et RICHTER (1929), prenant en considération les conclusions de GLASSMANN et POSDEEW d'après lesquelles la réaction violette est provoquée par les tanins, ont cherché à éloigner ces derniers des liquides soumis à l'épreuve. Notons qu'avant de procéder à ces recherches, REMY et RICHTER s'aperçurent bien que les tanins donnent, en présence du réactif B, non une réaction violette,

mais une réaction jaune. Mais, ayant remarqué qu'après une heure d'attente, la réaction jaune observée par eux virait au violet, ils abandonnèrent cette voie qui était pourtant la seule sûre. Après de nombreux essais, REMY et RICHTER ont élaboré un procédé qui consiste à traiter le liquide destiné à l'épreuve par addition d'alcali, et ensuite par addition d'acide chlorhydrique jusqu'à obtention d'une réaction faiblement acide. Ce procédé élimine d'après eux la faculté des tanins de provoquer la réaction violette, conservant celle de la vitamine C. Ils reconnaissent que, dans de nombreux cas, leur procédé se révèle inapplicable, les teintes obtenues présentant différents mélanges de bleu et de violet qui ne se prêtent pas aux mesures colorimétriques.

Le procédé de REMY et RICHTER devant, selon toute probabilité, conduire à une perte notable en vitamine C des liquides éprouvés et les données des auteurs n'ayant pas été contrôlées à l'aide d'épreuves sur cobayes, nous croyons inutile de les reproduire ici.

Nous résumerons enfin les données contenues dans une de nos propres publications (BEZSSONOFF, 1931), et qui concernent le rapport pouvant exister entre l'intensité de la réaction violette et la teneur en vitamine C active de deux préparations antiscorbutiques, isolées du suc de chou.

Obtention des préparations. — Toutes les opérations sont conduites dans une atmosphère d'azote ou dans le vide. L'azote est purifié par passage sur du cuivre incandescent. Les feuilles vertes du chou sont écrasées dans une presse spécialement adaptée, le jus exprimé tombant aussitôt dans un récipient rempli d'azote. On expérimenta avec deux sortes de préparations : la première,

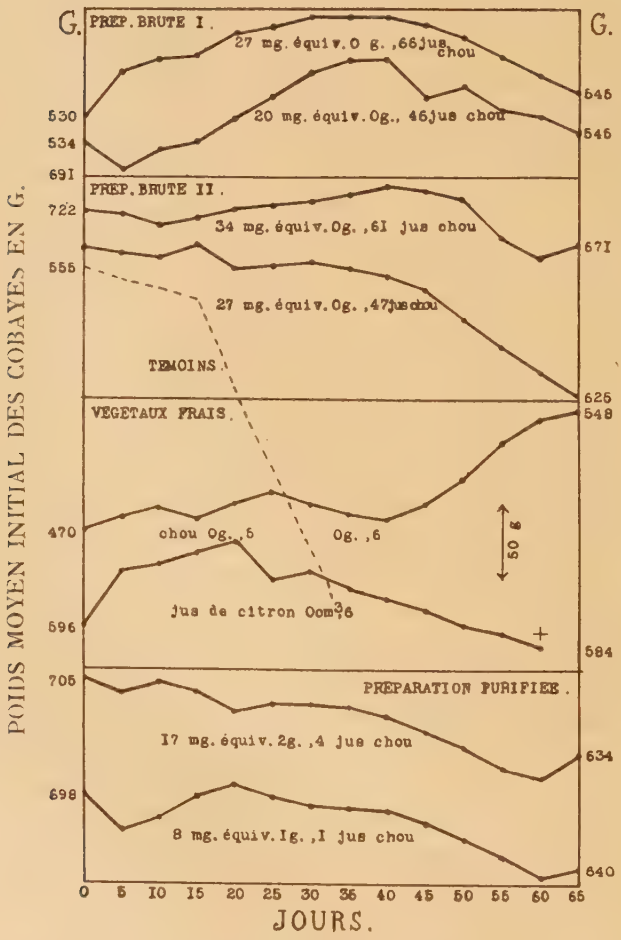
désignée « Préparation C brute », fut obtenue de la façon suivante: 100 litres de jus de chou furent mélangés avec 50 litres d'une solution d'acétate neutre de plomb, contenant 80 gr. de sel cristallisé par litre. Le précipité ainsi obtenu fut séparé sous pression d'azote, et le filtrat introduit dans un récipient rempli de SH^2 gazeux. Un brassage continu et l'augmentation de la pression en SH^2 éliminent rapidement le plomb du liquide. Débarrassé du sulfure de plomb, le liquide est évaporé dans le vide, à une température inférieure à 20°. On obtient ainsi un sirop jaunâtre, qui est ensuite desséché dans le vide à 40°. La substance desséchée est pulvérisée par trituration et répartie dans de petits tubes en verre.

Un autre genre de préparation, qu'on nommera ici « Préparation purifiée », fut obtenue en recourant aux opérations complémentaires suivantes: après défécation du jus de chou à l'acétate neutre de plomb, et élimination du précipité, on dissout, dans le filtrat, une quantité supplémentaire de 40 gr. d'acétate neutre de plomb par litre de jus de chou. On alcalinise ensuite au moyen d'une solution de soude caustique, exempte d'air, jusqu'à l'obtention du pH 8,2. Le précipité formé est séparé sous pression d'azote, lavé à l'eau, et dissous dans une solution d'acide acétique à 10 %. Les opérations finales sont les mêmes que celles déjà décrites plus haut. Les échantillons de préparation brute I et II et un échantillon d'une préparation purifiée furent soumis à une série d'épreuves sur cobayes. L'achèvement de la préparation brute II fut retardé de 24 heures par suite d'un accident au tube servant à la purification de l'azote.

La capacité des échantillons de ces préparations de

fixer le brome fut déterminée par la méthode KOPPESCHAAR-SIEGFRIED modifiée [BEZSSONOFF, 1928 (2)]. L'intensité relative de la réaction bleu-violette, donnée par les échantillons avec l'acide monomolybdo-phospho-tungstique, fut mesurée à l'aide du colorimètre DUBOSC.

GRAPHIQUE I



Variation du poids moyen des lots de cobayes.
Les doses antiscorbutiques indiquées se rapportent à 100 gr. de poids de l'animal.
- - - Temoins ; ration de base sans addition. + mort.

	Préparation brute I	Préparation brute II	Préparation purifiée
Br. fixé par I gr. d'échantillon en mg.	84,4	68,8	114,4
Nombre de cm^3 de jus de chou équivalent à 1 gr. d'échantillon	23,4	18,6	150,9
Fixation de Br. se rapportant à 1 cm^3 de jus, en mg. ..	3,60	3,69	0,75
Intensité de la réaction violette des échantillons, comparés à poids égal	1,1	1,0	2,0

Epreuve sur cobayes

Le régime de base consiste en un mélange de 86 gr. d'avoine, 10 gr. de son, 4 gr. de levure et 7,5 gr. de jaune d'œuf frais dilué dans 20 cm^3 d'eau. La nourriture étant préparée chaque matin et donnée à volonté, ainsi que de l'eau du robinet. Pendant les quatre premiers jours d'expérience, tous les animaux furent nourris au régime de base exclusivement.

Un lot de quatre animaux fut utilisé pour chaque épreuve séparée.

Résultats

Préparation I, dose 27 mg., gain moyen en poids 2,8 %
dose 20 mg., gain moyen en poids 2,0 %

Préparation II, dose 34 mg., perte moy. en poids 2,9 %
dose 27 mg., perte moy. en poids 13,8 %

Prép. purifiée, dose 17 mg., perte ..... 7,8 %
dose 8 mg., perte ..... 10,3 %

En consultant les tableaux et le graphique I, on remarquera que l'intensité de la réaction bleue donnée par la préparation purifiée ne dépasse que de deux fois celle obtenue avec une préparation brute, prise à concentration égale. D'autre part, une dose de préparation purifiée quatre fois moindre en poids que la dose juste suffisante de préparation brute (8 mg. contre 34 mg.) préserva, en fait, les cobayes du scorbut durant une épreuve de 80 jours.

HAHN et WIEBEN (1932) commencent par résumer les travaux des différents auteurs qui utilisèrent le réactif B pour le dosage de la vitamine C. Cet exposé les amène à la conclusion que, jusqu'à présent, il manquait une base commune permettant de juger de la valeur spécifique de la réaction violette. D'après eux, le fait suivant semble en être la cause: ce n'est qu'exceptionnellement qu'un auteur a fait simultanément et avec le même aliment des expériences sur animaux et l'épreuve à l'aide du réactif de BEZSSONOFF. Tous ceux qui travaillent avec des aliments connaissent quelles variations se produisent suivant les saisons, le lieu d'origine, le choix des espèces, l'état de maturité, etc... L'exigence que le même matériel devait être éprouvé sur l'animal et *in vitro* n'a été remplie que dans des cas isolés et jamais sur un grand nombre d'aliments. La plupart des auteurs se sont confiés, en ce qui concerne la teneur en vitamine C, aux données de la littérature; or, HAHN (1931) a exposé combien peu sûres étaient ces données. Si on examine, par exemple, les tables dans les travaux principaux de C. FUNK, R. BERG, J. KONIG, W. STEPP et GYORGY, H. SCHALL et A. HEISLER, et d'autres, on voit que le désavantage essentiel de ces tables résulte du fait qu'on y

trouve non les données d'un Institut, mais celles obtenues par différents expérimentateurs isolés. Tout d'abord le régime de base a été très différent dans les divers lieux d'expérimentation ; et la méthode de l'épreuve sur animal varie souvent.

Les auteurs pensent avoir pu éviter ces erreurs au cours de leurs propres recherches. La méthode qu'ils utilisèrent pour les épreuves colorimétriques fut la suivante :

La solution du réactif B. — Les auteurs ont employé la solution A préparée d'après les premières indications de BEZSSONOFF, la solution B préparée d'après GLASSMANN et POSDEEW, et la solution C qui fut préparée d'après BEZSSONOFF, mais qui a été conservée pendant un an en solution acidifiée par l'acide sulfurique.

Les auteurs ont ensuite étudié les valeurs des trois réactifs. La réaction a été observée comparativement : 1° à la température de laboratoire ; 2° après dix minutes de chauffage au bain-marie ; 3° après une heure de chauffage au bain-marie (suivant les indications de GLASSMANN et POSDEEW). Ces essais préalables furent faits en opérant avec des sucs végétaux, des extraits aqueux de foin, de jaune d'œuf, de levures et sur différents laits dilués.

Les auteurs constatèrent que la concordance entre les trois réactifs est relativement bonne, mais furent très étonnés de voir, dans certains cas, la réaction devenir plus intense après dilution des liquides éprouvés.

Ensuite, HAHN et WIEBEN, continuant l'exposé de la technique qu'ils adoptèrent pour contrôler la spécificité de la réaction violette, déclarent par avance que cette réaction ne doit pas concorder même qualitativement

avec les données obtenues par expériences sur animaux. Aussi ils considèrent comme inutile de mesurer avec précision l'intensité de la teinte violette au cours des épreuves qu'ils se proposent de faire. Pour pouvoir toutefois exprimer leurs résultats, ils adoptent une méthode d'appréciation de l'intensité de la réaction violette, extrêmement approximative.

D'après cette méthode, l'intensité de la réaction est mesurée à l'aide d'une unité, imaginée par HAHN et WIEBEN, mais dénommée par eux « nombre BEZSSONOFF ». Nous allons la désigner ici comme « unité HAHN ». Elle est définie par les auteurs à l'aide des trois exemples suivants: apparition immédiate d'une coloration violette foncée = 3 unités HAHN; apparition immédiate d'une coloration moyenne = 2 unités HAHN; apparition immédiate d'une coloration bleu pâle ou apparition retardée d'une coloration moyenne = 1 unité HAHN. Tous les degrés de coloration plus faible jusqu'à l'absence de la réaction sont estimés = 0.

Les aliments destinés à l'épreuve colorimétrique étaient utilisés, autant que possible, sous forme de jus exprimé, non dilué, centrifugé pendant 20 minutes.

L'unité-cobaye est calculée par HAHN et WIEBEN de la façon suivante: ils déterminent la quantité minimum d'un aliment nécessaire pour maintenir en bon état de santé l'animal en expérience et divisent ensuite 100 gr. par cette quantité. Si, par exemple, 0,5 gr. de jus d'orange est suffisant pour le cobaye soumis au régime scorbutigène afin de le conserver en bon état, les unités-cobaye égalent 200. Si 6 gr. de pêche sont nécessaires, le calcul donne 16 unités-cobaye.

Les auteurs indiquent qu'avec leur régime de base, se

composant de foin, d'avoine et d'eau *ad libitum*, on obtient, comme l'ont montré les épreuves de contrôle, un scorbut irrécusable dans 100 % de cas, auquel les animaux succombent entre le 30e et le 40e jour.

Notons que les régimes scorbutigènes strictement spécifiques, ceux de M/e RANDOIN, BEZSSONOFF ou HŒJER, déterminent la mort des cobayes les plus résistants dans un délai ne dépassant pas 33 jours. La survie des témoins, soumis au régime utilisé par HAHN, peut donc, d'après l'aveu de ce dernier, être prolongée d'une semaine, ce qui constitue une preuve indiscutable de la présence de la vitamine C dans ce régime.

Remarquons, en outre, que nous avons eu nous-mêmes l'occasion de nous convaincre que le régime: graines d'avoine + foin permet au cobaye, bien qu'exceptionnellement, d'atteindre le 50e jour.

Il est évident, d'ailleurs, que la teneur en microaliments du foin, qui est un mélange de tiges et de feuilles séchées, appartenant à différentes plantes annuelles, doit être extrêmement variable. Une étude systématique de la teneur du foin en vitamine A (HARTMAN, 1931) a montré que celle-ci varie de zéro à une quantité notable et efficace suivant la composition du foin et le mode de séchage employé. Le foin, constituant la seule source de vitamine A du régime « avoine et foin », les variations de sa teneur en cette vitamine ne peuvent pas ne pas exercer une influence considérable sur les résultats des épreuves faites à l'aide de ce régime. De plus, les variations bien établies de la teneur du foin en vitamine A soulignent la signification des quelques données qui indiquent l'existence des variations de sa teneur en vitamine C.

HAHN a eu d'ailleurs lui-même l'occasion de se convaincre à quelles graves erreurs peut entraîner l'emploi d'un régime scorbutigène comprenant le foin. Des expériences faites en appliquant un régime de ce genre le firent en effet conclure (HAHN, 1926) à la présence de la vitamine C dans l'extrait à l'eau bouillante des graines de café grillées, boisson couramment employée. Cette donnée fut réfutée par SCHEUNERT (1931) et se trouvait en contradiction manifeste avec tout ce qu'on connaissait déjà à l'époque sur les propriétés de la vitamine C.

Mettant en évidence l'imprécision du test biologique utilisé par HAHN et WIEBEN, nous ne pensons aucunement expliquer par là *toutes* les contradictions qu'ils constatèrent. Bien au contraire, nous estimons que la cause principale de ces contradictions réside non pas tant dans les erreurs dues à leur test biologique que dans la technique employée par les auteurs pour l'épreuve colorimétrique elle-même. Une des observations préalables de HAHN et WIEBEN, qui précède les séries de leurs épreuves comparatives et qui a pour objet la levure, l'atteste clairement.

D'abord avec KAY et ZILVA, et contrairement à BEZSSONOFF, LŒWY, KOOPMANN, MERJANIAN et d'autres auteurs, HAHN et WIEBEN ont constaté qu'un extrait de levure provoque, bien que tardivement, une coloration violette d'intensité moyenne. Or, l'absence de la vitamine C dans les levures ayant été établie par de nombreuses expériences de différents auteurs, l'erreur ne peut, dans ce cas, être attribuée au test biologique.

En ce qui concerne les séries d'épreuves comparatives, biologiques et colorimétriques, décrites dans la publication de HAHN et WIEBEN, nous pensons inutile de

citer les chiffres qui se rapportent à chaque cas isolé. Pour pouvoir juger de la concordance de leurs dosages, biologique et colorimétrique, il suffira en effet d'examiner le tableau qui les résume et que nous empruntons à HAHN et WIEBEN. Nous le faisons précéder d'une énumération des produits biologiques qu'ils ont examinés. Nous reproduisons également les remarques particulières que leur a suscité cet examen.

Fruits examinés: fraise, groseille rouge, framboise, cassis, airelle rouge crue, airelle rouge cuite, calville, pomme Kleo, Gravensteiner, pomme Jonathan, poire, pêche, coing cru, coing cuit, reine-claude, prune, orange, banane, raisin, ananas, citron, banane sèche, rhubarbe.

Un certain nombre de jus de fruits, comme par exemple le jus de groseilles, de framboises, de reine-claudes, etc..., ne pouvait être examiné sans recourir à une dilution; la coloration propre des jus ne permettant pas de distinguer exactement la coloration violette provoquée par le réactif.

Légumes examinés: épinard, navet, carotte nouvelle, carotte vieille, chou vert, chou blanc, choucroute, chourave, petit pois, haricot vert, flageolet, chou-fleur, chou de Bruxelles, salsifis, asperge, ail blanc, ail noir, chanterelle, laitue, endive, salade de laitue, céleri, oignon, persil, radis, raifort, courge, concombre, tomate.

Malheureusement, dans quelques cas, celui de la betterave par exemple, la réaction de BEZSSONOFF n'a pas pu être faite même après dilution 1:10, à cause de la coloration propre du jus. Dans d'autres cas, la valeur de la réaction n'est pas sûre pour cette même raison.

Ces 52 examens de légumes conduisent les auteurs à constater dans certains cas une concordance entre

l'épreuve biologique et la réaction colorée. Mais ils soulignent aussitôt les différences qui les ont frappés, par exemple l'examen du chou vert et du chou-rave à l'état cru et à l'état cuit. La teneur en vitamine C du chou-rave, obtenue par voie biologique, baisse après cuisson de 200 à 40 et la réaction de BEZSSONOFF ne change que de 3 à 2 (non dilué).

La teneur en vitamine C du chou vert baisse après cuisson de 150 à 33 (épreuve biologique), cependant la réaction de BEZSSONOFF n'accuse aucun changement.

La teneur en vitamine C du concombre (épreuve biologique) baisse après cuisson, cependant le concombre cru ne donne pas de réaction de BEZSSONOFF et le concombre cuit donne une coloration retardée de moyenne intensité.

Les auteurs en déduisent que la réaction de BEZSSONOFF donne non seulement des valeurs peu satisfaisantes en comparant les divers légumes entre eux, mais que les mêmes légumes, préparés de manières différentes, présentent des discordances.

Les espèces suivantes de conserves ont été examinées: épinard, haricot, tomate. Les résultats des épreuves colorimétriques et biologiques des conserves d'épinard montrèrent une certaine concordance. Les divers échantillons de conserves d'haricot et d'asperge ne marquèrent aucune différence, éprouvés au réactif de BEZSSONOFF ils se distinguaient pourtant d'après leur teneur en vitamine C, vérifiée par expérience sur cobaye. Une même réaction, très nette, fut observée en opérant avec des conserves de tomate les plus pauvres et les plus riches en vitamine C.

Dans le cas des orangeades, les auteurs déclarent

avoir obtenu une concordance entre le résultat de l'épreuve biologique et de l'épreuve colorimétrique un peu plus grande qu'au cours des expériences sur les fruits et les légumes.

Groupe	Orangeade	
1er groupe : Absence de vitamine C d'après le test biologique	Sunripe	Michelsen
	Bahrs	Henselsreimer
	Rania	Citronensaft
	Rathge	Houveling
	Kantorowicz	Citronade
	Kantorowicz	Nuturage
2e groupe : traces de vitamine C		Gilka
		Mampe
	Kantorowicz	Kantorange
		Califorange
		Citronenmost
3e groupe : présence de vitamine C		Zilgas
		Steinicke & Weilich
		Pahang
		Landauer & Macholl
		Natur-Citronenmost

L'opinion de GLASSMANN et POSDEEW concernant l'influence possible des sucres, sur la réaction de BEZSSONOFF a déterminé les auteurs à doser la teneur en sucre dans une série d'orangeades, éprouvées par eux. Ils reconnaissent n'avoir pu, au moins en ce qui concerne les orangeades, confirmer l'opinion de GLASSMANN et POSDEEW.

RÉSUMÉ

La teneur en vitamine C a été dosée par HAHN et WIEBEN simultanément dans 23 fruits, 52 légumes, 20

orangeades et 18 conserves, par épreuves sur animaux et à l'aide du réactif B. L'ensemble des résultats, concernant les fruits et les légumes, a été exprimé par les auteurs au moyen des tables qui suivent:

I

Teneur en vitamine C, obtenue par épreuve sur animal, exprimée en unités de cobaye	Réaction violette — suc exprimé non dilué			
	0 %	faible %	moyenne %	forte %
au-dessus de 10	30	40	30	0
10 à 25	20	30	40	10
25 à 100	0	25	60	15
au-dessus de 100	0	0	30	70

II

Teneur en vitamine C, obtenue par épreuve sur animal, exprimée en unité de cobaye	Réaction violette — suc exprimé dilué 1:10			
	0 %	faible %	moyenne %	forte %
au-dessus de 10	81	15	4	0
10 à 25	77	10	13	0
25 à 100	55	36	9	0
au-dessus de 100	27	27	46	0

Les auteurs concluent leur travail en déclarant la réaction violette privée de toute utilité en vue de l'identification de la vitamine C.

Une conclusion aussi catégorique s'accorde mal, cependant, avec l'ensemble des résultats expérimentaux rapportés par les auteurs eux-mêmes, à l'aide de leur première table (sucs non dilués). Son examen inciterait même à penser que le désaccord entre les tests colorimétrique et biologique ne dépasse pas le degré de précision de ce dernier. Nous savons que ce ne peut être le cas, car des données précises nous ont déjà montré que la spécificité de la réaction violette par rapport à la vitamine C n'est pas absolue.

Néanmoins, en ce qui concerne les résultats de HAHN et WIEBEN, seuls ceux résumés sur leur deuxième table, et qui furent obtenus avec des sucs dilués dix fois, manifestent nettement un désaccord entre les tests biologique et colorimétrique.

Cela veut dire que la précision des dosages colorimétriques faits par HAHN et WIEBEN diminua très considérablement dès qu'ils utilisèrent une quantité de réactif dix fois plus grande pour la même quantité de la substance éprouvée.

Rappelons, à ce propos, l'étonnement de HAHN et WIEBEN de voir augmenter l'intensité de la réaction violette à mesure qu'ils diluaient un liquide soumis à l'épreuve. Rappelons aussi que la technique qu'ils utilisèrent faisait apparaître une réaction violette dans les extraits de levures.

Ces trois constatations, ainsi que nous allons le voir plus loin, doivent être reliées au rapport réalisé entre la quantité de réactif introduit et celle de la substance réagissante.

ANALYSE DES DONNEES PARUES DANS LA LITTERATURE

On pourrait être tenté d'attribuer, en grande partie, le désaccord qui se manifeste entre les conclusions émises par les auteurs à une interprétation différente de données peu précises, mais essentiellement pareilles, interprétation influencée par leur opinion subjective. Il est certain que la grande approximation du test biologique et aussi des épreuves colorimétriques, telles qu'elles furent exécutées par les auteurs, laissent place à l'élément subjectif. On ne saurait cependant tirer des indications utiles de l'ensemble des recherches publiées sur cette question, en se bornant à critiquer les déductions et appréciations émises par les auteurs. Par contre, on ira droit au but en mettant en évidence les contradictions formelles entre les données expérimentales bien déterminées, publiées par différents auteurs. C'est là le genre de controverse que les auteurs de langue anglaise désignent du terme « conflicting evidences », qu'on pourrait traduire en français par l'expression « témoignages contradictoires ».

L'épreuve au réactif B des extraits aqueux de levures offre un exemple extrêmement significatif d'un tel témoignage. En effet, KAY et ZILVA déclarent que l'extrait aqueux obtenu de la levure provoque une réaction violette. Cependant, un tel extrait, préparé par moi en suivant exactement les indications données par ZILVA, donne une réaction jaune pâle sans aucune teinte violette [BEZSSONOFF, 1924 (1)]. LŒWY, soumettant à l'épreuve des extraits de levure et de différentes prépa-

rations, obtenues à partir de la levure, déclare n'avoir observé dans aucun de ces cas l'apparition d'une réaction violette. Une constatation analogue est faite par MERJANIAN. Par contre, HAHN et WIEBEN confirment les données de ZILVA. Ainsi l'objet de l'épreuve et le réactif étant les mêmes, les uns voient se produire une réaction violette, parfois assez forte, tandis que d'autres constatent l'absence de toute réaction colorée ou l'apparition d'une faible teinte jaune.

La cause d'une telle contradiction ne pouvait être due qu'à une différence essentielle dans le mode d'emploi du réactif B, adopté par les deux groupes d'expérimentateurs. Il était très important de pouvoir préciser en quoi consistait cette différence. Les extraits de levures ne contenant pas trace de vitamine C, il est évident que la technique qui conduisait à l'apparition de la réaction violette dans ces extraits limitait singulièrement la spécificité de la réaction, d'autant plus que les substances présentes dans la levure, qui provoquaient dans ce cas la réaction violette, pouvaient se rencontrer dans d'autres produits biologiques.

Le fait que plusieurs auteurs avaient constaté l'absence de coloration dans l'extrait de levures, traité par le réactif B, montrait que cette cause d'incertitude pouvait être évitée. J'ai pensé autrefois [BEZSSONOFF, 1924 (1)] qu'elle était due à l'emploi d'un réactif insuffisamment purifié. Ceci entre certainement en ligne de cause, mais la raison principale de ces discordances se révèle actuellement être tout autre.

Quand on ajoute à 10 cm^3 d'un extrait de levure suffisamment concentré une à deux gouttes d'une solution du réactif B à 7,5 %, on voit apparaître une faible

teinte jaune-brun. En ajoutant le réactif en grand excès, on verra la coloration jaune-brun se renforcer d'abord et ensuite virer au violet. Tout se passe de même que si l'on avait opéré avec une solution de tanin (voir chapitre I).

Tout comme les extraits de levures, le suc de prune, étant privé de vitamine C, ne donnait aucune réaction violette, éprouvé par BEZSSONOFF ou KOOPMANN, et provoquait cette réaction quand il était manipulé par HAHN ou GLASSMANN.

J'ai pu me convaincre que, dans les deux cas, la cause de l'erreur est la même. Elle est due à l'introduction d'une quantité excessive de réactif. L'excès du réactif détermine le virage au violet de la réaction primitive jaune-brun des composés polyphénolés, des dipcides du type des tanins qui sont habituellement présents dans les milieux biologiques. Quand le réactif se trouve employé en très grand excès, le virage au violet, provoqué par toutes les substances de ce type, présentes dans les liquides éprouvés, devient complet et la spécificité de la réaction s'avère, dans ce cas, nulle. C'est ce qui se produisait au cours des expériences de GLASSMANN et POSDEEW qui introduisaient le réactif non par gouttes, mais par centimètres cubes.

Pour éliminer la cause d'erreur due à la présence des tanins, on est tenté de prime abord d'essayer d'éloigner ces derniers des liquides destinés à l'épreuve. Il est facile de les débarrasser en grande partie des tanins qu'ils renferment en recourant à une défécation appropriée laissant intacte toute la vitamine C que ces liquides peuvent contenir. Par contre, un procédé suffisamment rapide qui permettrait d'éloigner *complètement* les tanins,

sans destruction aucune de la vitamine, ne paraît guère réalisable. Les tentatives faites dans cette direction par REMY et RICHTER ne peuvent que renforcer cette opinion.

Il existe cependant un moyen beaucoup plus simple d'écarter l'influence des tanins sur le dosage colorimétrique de la vitamine. Il consiste à régler les quantités de réactif, introduites au cours des épreuves, de façon à éviter un excès pouvant déterminer le virage au violet de la réaction jaune des tanins. Le fait que le réactif se fixe d'abord sur le réducteur diénolique type et que seule la quantité du réactif se trouvant en excès opère le virage au violet du tanin, ainsi que d'autres particularités de la réaction des tanins, permettent de le faire. Le mode opératoire à suivre sera indiqué au cours de l'exposé de notre technique. A cette place, nous nous contenterons de mettre en évidence une de ces particularités de la réaction des tanins, vu qu'elle se rapporte à certaines observations de HAHN et WIEBEN qui ont surpris ces auteurs.

Rappelons qu'une molécule de réducteur diénolique et de tanin, mise respectivement en présence de 3 et 9 molécules de réactif B, donne une réaction violette d'intensité égale et maximum. Quand, dans le cas particulier du tanin, on modifie ce rapport, diminuant le taux du réactif, on observe un abaissement brusque de l'intensité de la réaction colorée, abaissement non proportionné à cette diminution. La réaction s'intensifie tout aussi brusquement qu'elle s'affaiblit quand on rétablit le rapport optima des molarités. On peut le faire soit en augmentant la concentration du mélange en réactif, soit en diminuant celle en tanin. Dans ce dernier cas, le fait de diluer

la solution du tanin, la concentration en réactif B restant la même, provoque un renforcement net de la coloration. C'est là le genre de phénomène qui a surpris HAHN et WIEBEN.

Un exemple concret va nous permettre de préciser ce qui vient d'être dit au sujet des particularités de la réaction du tanin. Soit deux tubes contenant chacun par 10 cm^3 des solutions IO^{-5} N de vitamine C et de tanin. Introduisant dans ces tubes le réactif B par 5 mg., on verra se produire une coloration violette égale, à peine perceptible. Son intensité correspond pourtant au maximum pouvant être réalisé dans ce cas. En effet, la concentration du réactif B, réalisée dans le mélange réagissant, étant $IO.IO^{-5}$ N, est trois fois supérieure à celle qu'exige la solution de la vitamine. D'autre part, elle est suffisante pour déterminer le virage définitif au violet de la solution du tanin. Aussi un complément de réactif ne provoquera dans les deux cas aucun changement de la réaction colorée. Jusqu'à présent, les solutions de vitamine et de tanin se sont donc conduites de même. Cependant, si, au lieu de renforcer, on diminue la quantité initiale de réactif introduite dans ces solutions, l'aspect du phénomène va changer. En effet, en introduisant non pas 5, mais 2,5 mg. de réactif dans chacune des deux solutions, on constatera que celle qui contient la vitamine se colore comme précédemment, la solution de tanin restant pratiquement incolore. Si, par contre, sans modifier la quantité de réactif primitivement introduite, soit 5 mg., on renforce graduellement les concentrations des deux substances éprouvées, on verra doubler et tripler l'intensité de la réaction violette dans le tube qui contient la vitamine, tandis que celle provoquée par la solution du tanin faiblit et vire ensuite au jaune.

Ainsi, il est toujours possible de distinguer à l'épreuve au réactif B la vitamine C et les tanins. Par conséquent, il paraît inutile de chercher, comme l'ont fait REMY et RICHTER, à éliminer complètement les tanins des liquides destinés à cette épreuve.

Quand on compare les résultats obtenus par KOOPMANN, LŒWY et FRANK à ceux de GLASSMANN et POSDEEW, ou les données qui figurent sur le premier et le deuxième tableau de HAHN et WIEBEN, il devient évident que la cause d'erreur du test colorimétrique, de beaucoup la plus importante, était due à l'emploi du réactif en grand excès, ce qui déterminait le virage au violet des tanins présents dans les liquides éprouvés. Des erreurs dues à une cause juste opposée, l'emploi d'une quantité insuffisante de réactif, ne se laissaient pas bien distinguer, la précision du dosage étant dans tous ces cas très faible.

Une autre cause d'erreur, d'ailleurs assez exceptionnelle, est signalée par les observations de HAHN et WIEBEN, et KAY et ZILVA. Rappelons que les premiers constatèrent que le suc frais extrait du concombre, jouissant d'un pouvoir antiscorbutique, ne donnait pas de réaction violette, laquelle n'apparaissait qu'après l'ébullition du suc.

KAY et ZILVA ont observé, de leur côté, qu'une préparation isolée, après des traitements assez spéciaux, du jus de citron, conservait une faible action antiscorbutique, mais ne provoquait aucune réaction violette.

Nos propres observations nous ont montré que dans certains sucs végétaux la vitamine C peut être présente sous une forme combinée. La fonction diénolique de la vitamine étant dans ce cas éthérifiée, la réaction violette

n'apparaît qu'après hydrolyse. Ceci explique les constatations de HAHN concernant le suc de concombre. Dans le jus de citron, la vitamine C est présente sous sa forme libre. On peut cependant admettre que les traitements qu'ont fait subir au jus KAY et ZILVA ont déterminé une éthérification de la vitamine. Certaines données récentes de la littérature sont favorables à une telle supposition. Il est prudent toutefois, ainsi que nous l'avons montré antérieurement [BEZSSONOFF, 1927 (1)], de n'accepter les données des tests biologiques publiées par ZILVA qu'avec une certaine réserve.

Une toute autre cause d'erreur du dosage colorimétrique peut se manifester par suite de la présence de produits de dégradation de la vitamine C, privés d'action antiscorbutique, mais ayant conservé la fonction diénolique et, par conséquent, la faculté de provoquer la réaction violette. Nos propres données et celles des auteurs paraissent témoigner en faveur de l'absence de ces produits dans les sucs végétaux frais. Ils ne paraissent se rencontrer que dans les aliments antiscorbutiques soumis à la conservation et dans certains liquides de l'organisme animal. Il est curieux de constater que, d'après les observations de HAHN et WIEBEN, ces produits de dégradation étaient absents dans les différents sirops, orangeades et citronnades éprouvés par ces auteurs. Par contre, c'est leur présence qui détermine l'intensité de la réaction violette du suc de choucroute, notée par WEDGEWOOD et FORD, et FRANK, et qui ne correspond pas à l'activité antiscorbutique de ce suc.

Opérant avec le suc de choucroute, nous avons pu montrer récemment [BEZSSONOFF et VAN WIEN, 1934 (2)] qu'aussi dans ce cas il est possible de doser correc-

tement la vitamine C, utilisant le réactif B. Mais ceci exige l'application d'un procédé spécial dont nous allons maintenant indiquer brièvement les principes et qui sera précisé davantage au cours de l'exposé de notre technique.

Le dosage colorimétrique au réactif B, fait par comparaison avec une solution étalon d'hydroquinol, indique la concentration moléculaire en réducteur diénolique sans préjuger si ce réducteur est la vitamine C, son produit d'évolution ou le mélange des deux. En déterminant le potentiel du liquide éprouvé, pris en dilutions différentes et en exprimant la variation du potentiel en fonction de la concentration du liquide en réducteur diénolique, on obtient dans les trois cas une courbe caractéristique. D'après l'aspect de la courbe, on distingue facilement si l'on se trouve en présence de la vitamine C ou de son produit de dégradation. Quand il s'agit d'un mélange, il est également possible d'apprécier par ce moyen en quelle proportion y entre la vitamine C.

Arrêtons-nous maintenant à l'examen des deux difficultés que rencontra l'application de l'épreuve du réactif B et qui sont signalées par presque tous les auteurs. La première concerne la coloration propre des liquides éprouvés. Quand on opère suivant notre technique actuelle, cette difficulté se laisse généralement éliminer par la défécation du liquide et par sa dilution, nécessaire d'ailleurs en vue du dosage colorimétrique précis. Cependant, dans certains cas, le liquide peut conserver encore une légère teinte propre, au moment d'être traité par le réactif. L'inconvénient qui en résulte se laisse écarter par l'emploi de solutions témoins colorées de même que le liquide soumis à l'épreuve. Toutes ces mani-

pulations seront mentionnées plus en détail au cours de l'exposé de notre technique.

Mais il convient de signaler, dès maintenant, l'importance qui incombe à la défécation en tant que moyen permettant de rehausser la précision du test colorimétrique. Ainsi qu'on a pu le voir, ce moyen ne fut jamais usité par aucun des auteurs précités. Nous déféquons généralement les liquides destinés à l'épreuve à l'acétate de plomb en solution acide, pH 3,5. Dans certains cas spéciaux, nous recourons à une défécation à l'acide trichloracétique. J'ai pu montrer de longue date (BEZSSONOFF, 1922 (2), 1923 (1), 1931) que l'acétate de plomb ne précipite pas la vitamine C en milieu acide; cette donnée fut confirmée par la suite par de nombreux auteurs. L'acide trichloracétique est également considéré comme un excellent solvant de la vitamine C. N'entraînant aucune perte appréciable en vitamine, la défécation présente les avantages suivants:

1° Elle éloigne en grande partie aussi bien les pigments que les tanins qui se trouvent dans le liquide initial.

2° Elle permet d'éliminer les lipides présents en émulsion fine et qui peuvent exercer une certaine influence sur la réaction colorée [BEZSSONOFF, 1928 (2)].

3° La solution destinée à être traitée au réactif B est, dans ces cas, toujours limpide.

Or, la présence de suspensions dans le liquide soumis à l'épreuve peut aussi fausser la détermination colorimétrique. Ainsi, en introduisant des substances chimiquement inactives, telles les poudres fines de kaolin ou de charbon, dans des tubes remplis d'eau distillée, ajou-

tant ensuite du réactif et secouant les tubes, on provoque une réaction violette intense.

Il est utile de noter que le même phénomène se manifeste quand une telle épreuve est faite avec l'acide urique qui se présente sous forme de poudre microcristalline. Cependant, après avoir filtré soigneusement une solution aqueuse saturée d'acide urique, on constate que le filtrat ne provoque aucune réaction colorée en présence du réactif B. La solubilité de l'acide urique en solution aqueuse, acide et neutre, étant extrêmement faible, nous avons préparé la solution étalon de FOLIN qui contient 1 gr. d'acide urique par litre et peut être éprouvée en réaction acide. L'épreuve de cette solution au réactif B donna également un résultat négatif.

Notons que la filtration qu'implique la défécation, faite rapidement et en solution acide, n'entraîne aucune destruction notable de la vitamine.

Il nous reste à signaler une dernière difficulté, assez spéciale, mentionnée par les auteurs et qui se rattache à l'épreuve colorimétrique des laits. Quand on traite au réactif B le lait tel quel ou le petit-lait, on observe la formation d'un abondant coagulum. Ce coagulum et même le liquide surnageant peuvent parfois se teindre en violet, mais même dans ce cas il est difficile de baser sur une telle observation une détermination colorimétrique de la richesse du lait en vitamine C. Il suffit cependant, ainsi que nous l'indiquons en exposant notre technique, de déféquer le lait à l'acide trichloracétique pour que le traitement au réactif cesse de provoquer la formation d'un coagulum et permette de constater l'apparition d'une teinte violette proportionnée à la teneur du lait en vitamine C.

Nous avons commencé par mettre en évidence les causes qui déterminent une contradiction formelle entre les données expérimentales observées par les différents auteurs qui ont vérifié l'application du réactif B à la recherche de la vitamine C. Nous avons vu qu'elles se rattachent aux modifications du rapport entre la quantité de réactif B introduit et la concentration des substances soumises à l'épreuve. Ensuite nous nous sommes appliqués à préciser la nature des erreurs et des difficultés auxquelles se heurtaient les auteurs au cours de leurs recherches. Il nous reste à commenter les conclusions exceptionnellement favorables, formulées par KOOPMANN et LŒWY, et d'après lesquelles les résultats obtenus par simple épreuve au réactif B concordaient complètement avec ceux fournis par le test biologique.

Reconnaissons, en premier lieu que KOOPMANN et LŒWY ont utilisé une technique beaucoup plus adéquate que celle employée par d'autres auteurs, puisqu'ils ont su éviter la plus grande cause d'erreur, celle de l'emploi d'une quantité excessive de réactif. Il est difficile toutefois d'expliquer une concordance aussi parfaite du test colorimétrique utilisé par KOOPMANN et LŒWY avec le test biologique autrement que par la grande approximation de ces deux tests. Tout en faisant cette réserve, notons que les recherches de KOOPMANN et LŒWY, de même que l'analyse des données produites par d'autres auteurs, confirment que parmi toutes les autres causes d'erreur du test colorimétrique, celle due à l'emploi d'un excès de réactif est de beaucoup la plus importante. Si importante qu'elle soit en pratique, elle n'est en somme conditionnée que par les détails techniques de l'épreuve au réactif B.

D'autres erreurs, bien que rarement signalées par les résultats des auteurs, se relient cependant au principe même du dosage colorimétrique de la vitamine. Elles vont être mises en évidence au cours du chapitre suivant.

CHAPITRE TROISIEME

L'IDENTIFICATION ET LE DOSAGE DE LA VITAMINE C PAR L'ACIDE MONOMOLYBDO-PHOSPHO-TUNGSTIQUE

REMARQUES GENERALES CONCERNANT LES REACTIONS COLOREES DES VITAMINES

L'identification de la vitamine C à l'aide d'une réaction colorée rencontre des difficultés qui se rattachent à l'essence même du problème, posé dans sa forme la plus générale.

Bien qu'évidentes, elles échappent, jusqu'à présent, à l'attention des auteurs qui, souvent, persistent à rechercher dans ce domaine des solutions dont la possibilité est d'avance exclue. C'est pourquoi il nous paraît utile de signaler ces difficultés, d'autant plus qu'elles se présentent aussi bien dans le cas de la vitamine C que dans celui qui intéresse d'autres vitamines. Les difficultés en question sont dues au fait que le problème consiste à caractériser non pas un ion, mais une molécule. Or, s'il nous est souvent facile de certifier par une réaction chimique la présence d'un ion déterminé, le cas n'est plus le même quand il s'agit d'identifier une molécule.

On ne peut, en effet, s'attendre dans ce cas à une spécificité absolue de la réaction. Provoquée non par la

molécule dans son ensemble, mais par une fonction, par un certain groupement atomique, la réaction continue à se manifester tant que ce dernier se conserve, tout autre partie de l'édifice moléculaire pouvant être profondément modifiée.

Par contre, le groupement réagissant étant masqué, la faculté du composé de donner la réaction typique disparaît. Or, il peut être masqué par éthérification, ce qui s'observe fréquemment quand il s'agit de la vitamine C, ou par transposition intramoléculaire instable, dont la vitamine A nous offre un exemple, et dans ces cas la régénération de la molécule se fait avec grande facilité. Il arrive ainsi qu'après avoir constaté qu'un liquide ne donne pas la réaction typique, on est ensuite obligé de reconnaître que la vitamine recherchée y était néanmoins présente.

On ne peut donc s'attendre, en s'adressant uniquement à une réaction colorée, à pouvoir identifier avec sûreté la vitamine.

Cependant, les réactions colorées les mieux étudiées des vitamines, celles de la vitamine C et de la vitamine A, furent souvent considérées comme étant absolument spécifiques et permettant un dosage colorimétrique direct de ces principes. Le fait que certains traitements, appliqués à des substances riches en vitamine, éliminent simultanément la faculté de donner la réaction et l'activité physiologique spéciale, semblait le confirmer.

Mais, d'autre part, on constata également que les dosages de vitamines dans différents produits naturels, faits par réaction colorée et par épreuve sur animaux, indiquaient des valeurs pouvant s'écarter notablement.

En ce qui concerne la vitamine A, longtemps préva-

lut l'opinion que les écarts observés entre le dosage chimique, basé sur l'apparition de la teinte bleue en présence du $SbCl^3$, et l'épreuve biologique sont attribuables à l'incertitude de cette dernière. On en concluait à la spécificité absolue de la réaction du $SbCl^3$ par rapport à la vitamine A.

En 1929, j'ai publié des données qui s'y opposaient formellement. Mais ce n'est qu'en 1931, quand paraissent les vastes recherches de MORTON qui confirmèrent et complétèrent mes indications obtenues en 1929, que l'absence de spécificité stricte de la réaction du $SbCl^3$ devient évidente pour tout le monde. Et cependant, cette réaction est invariablement provoquée par la viamine A éprouvée à l'état pur.

Quant au réactif B, son application au dosage de la vitamine C fut discutée dès le début. Certains auteurs trouvèrent que la concordance entre le dosage colorimétrique et les données des épreuves sur cobayes est parfaite ou satisfaisante. Les écarts, observés exceptionnellement, étant dus à des causes fortuites. D'autres, au contraire, ayant constaté dans quelques cas des contradictions entre les résultats obtenus par les deux méthodes, déclarèrent l'épreuve au réactif B dénuée de toute valeur.

Rappelons que nous n'avons jamais adopté les conclusions de l'un ou de l'autre groupe.

Déjà nos premières publications (1921, 1922) concernant le réactif B, tout en mettant en évidence le lien causal qui existe entre la réaction violette et la vitamine C, insistaient sur le fait que la spécificité de cette réaction n'est pas absolue. Mais cela ne signifiait aucu-

nement, d'après nous, qu'elle ne pouvait dès lors présenter aucun intérêt pour l'identification de la vitamine.

Pour en juger, ce qu'il importait avant tout, était de savoir si la réaction concernait une substance accompagnant la vitamine ou un groupe atomique présent dans la molécule de la vitamine elle-même. Cette donnée présentait déjà en soi-même un grand intérêt puisque la nature chimique de la vitamine, établie en 1933, était totalement inconnue en 1921.

Or, la réaction violette s'adresse bien à la fonction diénolique — C O H : C O H —, présente dans la molécule de la vitamine C. Les indications que j'ai fournies à ce sujet depuis 1921 reçurent une confirmation entière dès que le problème de l'obtention de la vitamine C à l'état pur fut définitivement résolu.

Il est toujours possible d'utiliser une réaction colorée stable que provoque quantitativement un groupe chimique présent dans la molécule d'un corps pour le dosage de ce dernier. Mais pour qu'un tel dosage soit pratiquement applicable, la réaction colorée ne doit être provoquée que par un groupe atomique défini, bien caractéristique. Hormis le corps qu'on désire doser, d'autres qui possèdent ce même groupe doivent être rares et normalement absents dans les milieux habituels destinés aux épreuves. Une technique appropriée peut alors pallier à l'absence de spécificité stricte de la réaction. Il est possible, en outre, de compléter ou de combiner les indications fournies par cette dernière avec d'autres indices.

Ces moyens permettent d'aboutir à une méthode de dosage correct d'une vitamine, pourvu que la réaction, sans être strictement spécifique, soit sélective dans la mesure qui vient d'être indiquée.

La spécificité de la réaction violette par rapport à la vitamine C.

Nous avons décrit précédemment (chapitre I) les colorations que provoque le réactif B avec des corps chimiques définis se trouvant en solution aqueuse et acide.

En ce qui concerne la réaction violette, nos données indiquaient qu'elle possède envers la vitamine C une spécificité particulière, dépassant celle qu'on en pouvait attendre.

Provoquée par la fonction diénolique de la vitamine C, la teinte violette devrait, en effet, apparaître en présence de tous les corps qui possèdent la même fonction. Parmi ces corps, les composés polyphénolés, en particulier les tanins, sont fréquents dans les milieux biologiques naturels. Aussi leur faculté de provoquer cette réaction aurait pu diminuer de beaucoup sa valeur spécifique. Il s'est avéré, cependant, que ces substances donnent généralement avec le réactif B une coloration jaune-brun, nettement différente de la réaction violette. Cette dernière n'apparaît dans ces cas qu'en présence d'un grand excès de réactif ou est même complètement évincée. Un tel effet, dû à l'interférence de certains groupes atomiques qui voisinent dans ces corps la fonction diénolique, contribue, singulièrement, à renforcer la spécificité de la réaction violette par rapport à la vitamine C.

Toutefois, nous avons mis en évidence quelques rares composés qui provoquent la réaction violette absolument de même que la vitamine C. Ces corps, tel que le pyrocatéchol, le reductone, le quinhydrol, la catéchine, sont des produits de laboratoire. Pris tels quels, non sous une forme combinée, ils ne semblent pas devoir se trouver communément dans les milieux naturels.

Ceci n'exclut pas, bien entendu, toute possibilité de rencontrer dans ces milieux un corps essentiellement différent de la vitamine C, capable de provoquer la réaction violette typique. Mais on peut admettre que cette possibilité ne se réalise que très rarement.

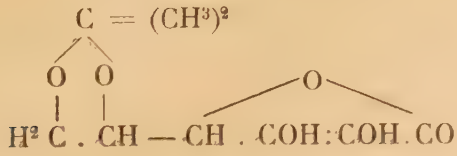
De fait, nos propres recherches et celles d'autres auteurs n'ont jamais pu établir avec certitude la présence dans un milieu naturel d'un corps provoquant la réaction violette et absolument étranger à la vitamine C.

Une toute autre cause limite effectivement la spécificité de cette réaction. Elle réside dans les modifications que subit la molécule de la vitamine elle-même quand elle se dégrade ou entre en combinaison.

Déjà la structure de la vitamine C

témoigne de son aptitude à se modifier dans les deux sens indiqués.

Bien qu'elle ne fait que débuter, l'étude des dérivés de la vitamine fournit déjà à ce sujet quelques exemples concrets. Ainsi l'acide ascorbique-mono-acétonique :



préparé pour la première fois par VARGHA (1932), se forme par fixation du reste de l'acétone sur le groupe

glycolique de la molécule de la vitamine C (MICHEEL, 1933). Conservant la fonction diénolique libre, ce composé conserve aussi entièrement la faculté de provoquer la réaction violette. Cependant, administré au cobaye par voie buccale, il n'exerce qu'une faible action antiscorbutique. Elle devient nulle quand on l'introduit par injection sous-cutanée, tandis que l'efficacité de l'acide ascorbique libre, administré par ce procédé, reste entière (MICHEEL et MOLL, 1933). Toutefois, la mono-acétone vitamine est facilement hydrolisée, régénérant la vitamine libre. Ceci explique que ce dérivé puisse exercer une certaine activité physiologique quand il est introduit par la bouche. Elle est due à l'hydrolyse partielle qu'opère le suc gastrique.

Un autre dérivé de la vitamine C, dont les propriétés sont aussi actuellement bien connues, est la dimethyl vitamine :

(MICHEEL et KRAFT (4), 1933). La fonction diénolique se trouvant éthérifiée, ce composé ne peut provoquer la réaction violette. Il est privé de toute action antiscorbutique. Celle-ci réapparaît cependant après hydrolyse suffisamment énergique, susceptible de déméthyler la vitamine.

Nous nous bornerons à citer ces deux dérivés comme étant les mieux étudiés. Nos connaissances concernant la chimie de la vitamine C sont encore trop incomplètes pour pouvoir désigner ne fût-ce que les principaux types des formes combinées de la vitamine et des produits

immédiats de sa dégradation pouvant exister dans la nature. Elles suffisent néanmoins pour expliquer les contradictions, dès longtemps constatées, entre la faculté de certains liquides biologiques de donner la réaction violette et leur teneur en vitamine C active. Précisons maintenant, à l'aide d'exemples qui nous paraissent les plus démonstratifs, en quoi consistent ces contradictions.

L'urine d'un homme qui absorbe la vitamine C peut contenir cette vitamine sous forme active ou dégradée [Bezssonoff et Delire (2), 1933, Van Eckelen, Emmerie, Josephy et Wolf (1934)]. Dans les deux cas, l'urine provoquera néanmoins la réaction violette. Mais elle cesse de se produire dès qu'on prive le sujet de tout apport de vitamine C.

Le chou est un végétal exceptionnellement riche en vitamine C. Le jus de choucroute provoque ordinairement une réaction violette intense, mais celle-ci est loin de correspondre à sa teneur en vitamine C active (Wedgedoow et Ford, 1924; Bezssonoff et Van Wien (2), 1934).

Par contre, une substance cristalline, que j'ai obtenue à partir du suc de chou en 1925, et qui possédait une action sur cobaye égale à celle de la vitamine pure, ne provoquait pas la réaction violette (Bezssonoff, 1925). Elle n'apparaissait qu'après hydrolyse légère de ce composé. Quant à ce dernier, ses caractères, décrits en 1925, permettent actuellement de l'identifier comme un dérivé de l'acide ascorbutique, vraisemblablement la monométhyl-vitamine (1).

---

(1) La composition élémentaire de cette substance fut indiquée en 1925 comme suit : C, 45,57 % ; H, 6,19 % ; O, 48,24 %. Celle calculée pour la monométhyl-vitamine est de : C, 44,2 % ; H, 5,3 % ; O, 50,5 %. Si l'on considère que la substance, isolée en 1925, devait

La présence d'une forme combinée de l'acide ascorbique dans le suc du chou fut d'ailleurs établie à l'aide de nombreuses épreuves au réactif B du suc même. Les exemples que nous venons de produire montrent que, dans certains cas, la discordance entre les indications que fournit l'épreuve au réactif B et la teneur effective en principe ascorbutique du liquide éprouvé se laisse écarter par recours à une hydrolyse appropriée. On peut ainsi éliminer l'erreur en moins à laquelle conduit dans ces cas un dosage direct au réactif.

Mais on a pu également se rendre compte qu'il existe aussi une cause d'erreur en plus, conditionnée par la présence de produits immédiats de la dégradation de la vitamine. Ces produits étant définitivement privés d'action antiscorbutique, peuvent avoir conservé la fonction diénolique et par conséquent la faculté de provoquer la réaction violette.

Il s'agit donc de pouvoir distinguer si la réaction violette qu'on a observée est due à la vitamine active, à un produit de sa dégradation ou au mélange des deux. On verra par la suite qu'une telle distinction devient possible à condition de combiner l'épreuve au réactif B avec des mesures du potentiel des liquides éprouvés. Le principe de ce procédé fut indiqué au cours de l'exposé précédent.

---

encore contenir des impuretés, le rapprochement des chiffres devient très significatif. Le poids moléculaire de ce composé fut déterminé comme voisin de 200. D'après la détermination crioscopique, faite en 1925, il était de 200 à 230. L'acide ascorbique étant un électrolyte fortement dissocié, p K 4,2 (Birch et Harris, 1933), les déterminations crioscopiques du poids moléculaire devaient forcément indiquer des valeurs dépassant la valeur réelle. Une détermination basée sur la teneur en K du composé potassique donna 184 (Bezssonoff, 1928). Le poids moléculaire théorique de la monométhyl-vitamine égale 190. Tout autre dérivé de l'acide ascorbique d'un poids moléculaire voisin de 200 donnerait à l'analyse des chiffres s'écartant très considérablement de ceux trouvés expérimentalement.

A cette place, nous nous bornerons à attirer l'attention sur les deux causes essentielles qui limitent la spécificité de la réaction violette par rapport à la vitamine C active: l'existence de formes combinées de la vitamine et de ses produits immédiats de dégradation contenant intact le groupe diénolique.

L'examen des données obtenues par les différents auteurs qui étudiaient la valeur de la réaction violette en tant qu'indice de la vitamine C, a montré qu'il existe encore d'autres causes d'erreur. Dues à l'imperfection des techniques de l'épreuve même, au réactif B, elles se laissent actuellement éliminer sans peine.

Application du réactif B au dosage du réducteur diénolique

Principe de la méthode

L'intensité de la coloration violette qui apparaît en présence d'un excès de réactif dans une solution contenant 1/1.000 mg. d'hydroquinol par 1 cm^3 d'eau, soit environ 1/100.000 N ou IO^{-5} N, est choisie comme unité colorimétrique utilisée au cours du dosage. Cette unité sera désignée U. H. (unité hydroquinol) (1). Deux gouttes contenant 10 mg. de réactif B, introduites dans 10 cm^3 de solution d'hydroquinol à 1, 2, 3 et 4 IO^{-5} N, engendreront donc des colorations correspondant à 1, 2, 3 et 4 U. H. Les mêmes gouttes ajoutées à 10 cm^3 de jus de citron dilué au 1/100, provoqueront une intensité de teinte violette proche du 3 (U. H.). La concentration du

(1) Rappelons que l'intensité de la coloration violette, provoquée par une solution d'hydroquinol dont le titre est exactement 10^5N, soit 0,0011 milligr. d'hydroquinol par centimètre cube, est désigné par le symbole U. H.

réactif, étant 10 mg. dans 10 cm^3, dépasse 20 IO^{-5} N, elle est donc suffisante pour assurer une intensité de teinte voisine de 7 (U. H.). Par conséquent, l'intensité de la teinte observée n'est limitée que par la concentration du réducteur diénolique présent dans le jus. Cette dernière se révèle voisine de 3.10^{-5} N 100, 3.10^{-3} N ou 3 N/1.000. Ce chiffre, exprimé en (U. H.), correspond à 300 (U. H.). Autrement dit, la teneur du réducteur diénolique du jus de citron égale 300/100.000 N. Admettant que le principe antiscorbutique se trouve sous la forme de l'acide ascorbique libre (poids moléculaire = 176), ceci équivaudrait à une teneur de 0,5 mg. d'acide ascorbique par 1 cm^3 de jus de citron. Ainsi qu'on verra plus loin, mesurée exactement, cette teneur dans le jus de citron mûr et bien conservé est légèrement supérieure à ce chiffre.

Causes d'erreur

Le dosage du principe antiscorbutique dans le jus de citron est exceptionnellement facile. 1° L'addition du réactif au jus ne provoque pas de précipité. 2° La teneur en tanin étant négligeable, la réaction jaune ne vient point troubler la détermination de la teinte. 3° La coloration propre du jus étant faible, disparaît dans les fortes dilutions utilisées pour le dosage. Une légère turbidité est la seule cause qui influe sur la précision du dosage du jus non déféqué. Dans d'autres cas, les causes d'erreur qui viennent d'être signalées peuvent non seulement fausser le dosage, mais le rendre même impossible. Afin de les éliminer, nous avons eu recours à la défécation préalable des liquides éprouvés et à une technique spéciale concernant l'obtention et la mesure de la réaction bleu-violet.

Solutions nécessaires

1° Déféquant A. P. A 100 gr. d'acétate neutre de plomb et 110 cm³ d'acide acétique glacial, on ajoute environ 600 cm³ d'eau distillée. On vérifie si le pH est voisin de 3,5 et on complète au litre par de l'eau distillée.

2° Solution d'acide trichloracétique à 30 %.

3° Sulfate de soude cristallisé (Na_2SO_4 - 10 H_2O) 200 gr., eau distillée q. s. 1 litre.

4° Tampon pH 3,5. A 100 gr. d'acétate de soude, on ajoute 350 cm³ d'acide acétique glacial et 350 cm³ d'eau distillée, on ajuste le pH de la solution à 3,5 et on complète au litre.

5° Solution de tanin. Tanin à l'alcool pour analyse. 700 mg., 20 cm³ de formol (formol 40°), compléter au litre par la solution tampon 3,5. La solution mise en flacon brun, bouché à l'émeri, se conserve trois semaines environ.

6° Solution hydroquinol. Elle se conserve mal et doit être préparée chaque deux jours fraîche. *a*) On prépare une série de petits paquets en papier parchemin contenant chacun 100 mg. d'hydroquinol (1). *b*) Un paquet est dissous dans 100 cm³ d'eau distillée. *c*) 1 cm³ de cette solution est de nouveau complété jusqu'à 100. On obtient ainsi une solution contenant 0,010 mg. d'hydroquinol par

(1) On utilise 100 et non 110 milligr., chiffre qui correspondrait au P. M. de l'hydroquinol, car l'intensité de la réaction violette provoquée par une molécule d'hydroquinol dépasse de 10 % environ celle produite par une molécule de vitamine C. Abaissant de 10 % le titre de la solution étalon, on élimine cet écart.

1 cm^3, soit 10 U. H. *d*) Dans quatre tubes calibrés à verre incolore et munis d'un trait correspondant à 10 cm^3 on introduit 1, 2, 3 et 4 cm^3 de cette solution. *e*) Dans chaque tube, on introduit deux gouttes (soit 10 mg.) de réactif et on les complète à 10 cm^3 par de l'acide sulfurique à 5 % volumétrique. Préservé de l'action de la lumière, l'étalon se conserve deux à trois jours.

7° Réactif B. On dissout dans 200 cm^3 d'eau redistillée sur permanganate 74 gr. de tungstate de soude et 8 gr. d'acide phosphomolybdique chimiquement pur. La solution est conservée quatre jours à la température ordinaire à l'abri de la lumière. Ensuite, on la décante, éliminant ainsi un dépôt cristallin, et on verse dans la solution 10 cm^3 d'acide orthophosphorique concentré (densité 1,75). D'autre part, on a préparé des solutions d'acide sulfurique dans l'eau bidistillée à 50, 15 et 5 % volumétrique. La solution molybdo-phosphotungstique est portée à la température de 50° C. environ et additionnée de 85 cm^3 d'acide sulfurique à 50 %, versée goutte à goutte en remuant le flacon. On laisse refroidir à l'abri de la lumière. Après huit heures, la cristallisation est achevée. On décante et on récolte les cristaux sur un filtre qui a été lavé au préalable par l'acide sulfurique tiède à 15 %. On lave les cristaux par 50 cm^3 de la même solution acide (15 %) à froid. Afin de vérifier la pureté du réactif obtenu, on introduit les dernières gouttes des eaux de lavage dans un tube à essai contenant une solution de pyrogallol à 1/1.000 environ. Le réactif pur donne une réaction jaune-brun qui se conserve telle à l'abri de la lumière pendant plusieurs jours. La présence d'impuretés provoque un virage au violet. Si ce virage a lieu après deux heures d'attente, le réactif

peut encore être utilisé, s'il se produit plus tôt on recommence de nouveaux lavages ou la recristallisation. Après l'épreuve, les cristaux sont rapidement séchés entre deux feuilles de papier filtre suédois. On dissout 7,5 gr. de cristaux dans 100 cm^3 d'acide sulfurique à 5 %. La solution est mise dans un flacon compte-gouttes en verre brun. Nos flacons donnaient 15 gouttes par centimètre cube. Par conséquent, chaque goutte contenait 5 mg. de réactif cristallin. La masse restante des cristaux peut être conservée en tubes scellés dans un vide poussé à 20 millimètres de mercure environ. Les tubes enveloppés de papier noir sont gardés dans une boîte fermée.

Préparation des liquides à analyser

On évite toute filtration préalable des liquides éprouvés, se bornant, en cas de besoin, à une décantation. En règle générale, on commence par ajouter à 10 cm^3 du liquide éprouvé 6 cm^3 de déféquant A. P. On attend trois minutes et, sans filtrer, on ajoute 4 cm^3 de sulfate de soude. Après trois minutes d'attente, on filtre. Cette manière d'agir proposée par SCHLEMMER, BLEYER et CAHNMANN (1932) se justifie du fait que seul le Pl non combiné au coagulum réagit avec SO_4. A 10 cm^3 de filtrat, on ajoute une goutte (soit 5 mg.) de réactif. On observe alors, dans certains cas, celui des jus de végétaux frais excepté, l'apparition d'un trouble gênant la détermination colorimétrique. Il est très abondant et se produit toujours quand on opère avec du lait. Pour éliminer cet obstacle, on a recours à un autre procédé de défécation. A 20 cm^3 du liquide éprouvé pris tel quel ou dilué à moitié par de l'eau distillée s'il s'agit de lait, on

ajoute 20 cm^3 de la solution trichloracétique. On filtre sur un filtre serré et on éprouve le filtrat au réactif. L'addition du réactif B à l'urine, déféquée à l'acétate de plomb, provoque fréquemment un précipité. Il est parfois impossible de recourir à la défécation de l'urine par l'acide trichloracétique. Dans ce cas, on a recours à des dilutions de l'urine. Après qu'elle a été diluée quatre à sept fois, le précipité ne se forme plus.

L'épreuve colorimétrique

Nous désignerons les liquides dilués 2, 3, 4 fois, etc., du terme « dilution 2, 3, 4 », etc. Nous opérons toujours sur 10 cm^3 de solution. L'expression « on ajoute une goutte de réactif à la solution 2 » signifie donc qu'une goutte, soit 5 mg. de réactif, fut introduite dans 10 cm^3 d'une solution du liquide éprouvé dilué 2 fois. Après défécation, les liquides se trouvent toujours dilués au moins 2 fois. Rappelons qu'une goutte, soit 5 mg., de réactif introduite dans 10 cm^3 d'une solution contenant un réducteur diénolique suffit pour assurer une coloration violette égale à environ 3,5 U. H., deux gouttes à 7 U. H., et ainsi de suite. On commence toujours par ajouter une goutte de réactif à la solution la plus concentrée, donc à la dilution 2 ou 3.

Premier cas. — La coloration est bleu-violet sans nuance mauve appréciable. Si l'intensité de la coloration ne dépasse pas 2 U. H., on procède immédiatement à la mesure colorimétrique.

Remarque: quand on opère avec des liquides peu dilués (urine, par exemple), leur propre coloration peut modifier la teinte de la réaction colorée. Dans ce cas, on

aura recours au comparateur. On place le tube contenant la solution éprouvée dans un nid du comparateur, derrière lui un tube rempli d'eau et dans les deux nids voisins un tube étalon et un tube contenant la solution éprouvée non additionnée de réactif.

Si la solution éprouvée a provoqué avec une goutte de réactif une coloration violette d'une intensité voisine de 3,5 U. H., on augmente la dilution de façon à obtenir une coloration ne dépassant pas 4 U. H. quand on ajoute deux gouttes, et 2 U. H. quand on ajoute une goutte de réactif.

Deuxième cas. — Les liquides provoquant uniquement la réaction type tanin, une coloration jaune-brun virant au violet en présence d'un grand excès de réactif.

Quand on ajoute à 10 cm^3 de jus de prune dilué deux fois une à deux gouttes de réactif, on observe une coloration jaune-brun de teinte pareille à celle qu'on obtient en introduisant deux gouttes de réactif dans 10 cm^3 de la solution tanin ou en ajoutant au réactif du pyrogallol. Le même phénomène peut être reproduit en opérant avec un extrait de levures suffisamment concentré. On en conclut que dans ces liquides il n'y a que des traces de réducteur diénolique ou qu'il en est complètement absent. Ceci correspond aux données obtenues par l'épreuve sur le cobaye.

En ajoutant au jus de prune et à l'extrait de levures du réactif en grande quantité, on observe une coloration violette par laquelle se manifestera la deuxième phase de la réaction type tanin.

Troisième cas. — Apparition simultanée de la réaction diénolique et de la réaction type tanin. En opérant avec l'urine, on observe parfois que l'addition d'une

goutte de réactif à la dilution 2 provoque une coloration mauve qui s'intensifie sans changer de nuance quand on introduit une deuxième goutte. Il s'agit d'établir que la coloration bleu-violet qui entre dans la composition de la couleur mauve correspond à la réaction diénolique et il faut la mesurer. Rappelons que la coloration violette engendrée par les tanins (deuxième phase) s'intensifie quand on augmente la dilution, la quantité du réactif restant la même, et qu'un réducteur diénolique type ne peut donner lieu à pareil phénomène. On commence donc par s'assurer que l'addition à la solution 2 d'une 2e, 3e et 4e goutte de réactif ne provoque aucun virage dans le violet de la coloration mauve. On a recours à la comparaison avec des solutions de tanin additionnées de réactif jusqu'à l'obtention de la teinte mauve voulue. Ces solutions correspondent à des dilutions différentes, le rapport tanin-réactif étant toujours le même. Si la couleur mauve s'intensifie sans virer au violet, la teinte violette comprise dans cette coloration n'est pas due au tanin, mais au réducteur diénolique. Pour la mesurer, on recherche des dilutions convenables, l'intensité de la coloration qu'on détermine ne devant pas dépasser 4 à 6 U. H. Afin d'éliminer la réaction jaune-brun, on a recours au comparateur et à des solutions témoins ayant une coloration jaune-brun franche, d'intensité différente. On les obtient en ajoutant 4 gouttes de réactif à 20 cm^3 de tanin. On introduit ensuite 6, 5, 4, 3 et 2 cm^3 de cette solution en tubes calibrés et on complète les tubes au trait de 10 cm^3 par de l'eau distillée. On place dans le comparateur un tube contenant la solution éprouvée adossée à un tube rempli d'eau. Dans les deux nids restants, on met un tube avec la solution jaune et un des

tubes étalon mesurant l'intensité de la réaction violette. On combine ces deux derniers tubes de façon à obtenir une coloration de teinte pareille et d'intensité égale à celle que donne la combinaison des deux premiers tubes. La détermination est répétée opérant avec une dilution du liquide éprouvé voisine de la première (la quantité de réactif ajouté restant la même). Exemples : urine dilution 8 et 6, jus de chou dilution 100 et 80. Si l'urine à la dilution 6 marque 2 U. H. et à la dilution 8, 1,5 U. H., 6 fois 2 et 8 fois 1,5 égalent 12, les deux mesures s'accordent. Les 5 mg. de réactif (une goutte) ajoutés dans les deux cas suffisaient pour obtenir une coloration égale à 3 U. H., l'excès nécessaire en réactif se trouvait donc assuré. D'autre part, la teneur proportionnellement plus grande en réactif dans le cas de la dilution 8 n'influence pas la mesure, celle-ci est donc correcte.

Ajoutant en grand excès le réactif à la solution éprouvée, on observe que la coloration mauve vire complètement au bleu-violet et on constate l'existence d'un second maximum d'intensité de la coloration violette. Il correspond à la fin de la deuxième phase de la réaction tanin.

On apprend le mieux la technique de ces mesures en expérimentant avec l'urine des cobayes. Cette urine provoque toujours une forte réaction type tanin et on a l'avantage de pouvoir contrôler avec sûreté les déterminations. Exemple : durant deux jours, quatre cobayes reçoivent comme nourriture une ration strictement scorbutigène (régime de M^me^ RANDOIN ou de BEZSSONOFF) additionné de chou vert ou d'herbe donnés à volonté. On prive ensuite deux animaux de tout supplément antiscorbutique et, 24 heures après, on récolte séparément

l'urine des deux paires de cobayes. Après défécation, on ajoute aux urines (dilution 4 ou 8) deux gouttes de réactif. On observe une coloration mauve de l'urine des cobayes absorbant la verdure et jaune-brun de celle des deux témoins. On verra plus loin que le pouvoir décolorant vis-à-vis des dichlorphénol-indophénols, des dérivés de l'acide ascorbique et du tanin se manifeste d'une manière différente. Ceci permet de s'assurer d'une façon définitive si la coloration violette observée était provoquée par le tanin ou par un réducteur diénolique. La présence des tanins peut provoquer, le réactif étant ajouté en grand excès, une erreur en plus. Mais il existe une cause qui peut déterminer des erreurs en moins. L'acide ascorbique peut être présent sous forme d'une combinaison dans laquelle la fonction diénolique, qui assure l'apparition de la coloration violette, se trouve bloquée. Ainsi, mesurée rapidement à l'aide du réactif, la teneur en vitamine C du jus des feuilles vertes du chou pommé et du jus de citron peut se révéler égale. Or, d'après l'expérience sur le cobaye, leur rapport doit être 1,5 à 1.

Il a déjà été démontré (BEZSSONOFF, 1924) qu'une hydrolyse prudente, une minute d'ébullition en milieu acidulé, augmente notablement la capacité du jus de chou, ramené à la température ordinaire, de donner la réaction bleu-violet. Ce phénomène se laisse facilement observer en soumettant à un chauffage très bref en autoclave (105° pendant 30 secondes) des solutions de jus de chou et de citron ajustées au pH 2,2 et en comparant les réactions qu'elles provoquent ensuite avec celles des mêmes solutions non chauffées. Il est toutefois difficile d'obtenir en recourant au chauffage des résultats constants

et un dosage exact. Par contre, on aboutit à un dosage direct en notant l'effet final d'une hydrolyse lente du réducteur combiné qui se produit à la température ordinaire (20° C. environ) en présence d'un léger excès de réactif. Exemple: l'intensité de la coloration violette qui apparaît dans le jus de citron, traité avec un léger excès de réactif, ne change pas au cours de la conservation durant 18 heures et plus. Ainsi qu'il sera montré plus loin, la substance antiscorbutique du jus de citron se trouve en solution sous une forme ayant sa fonction diénolique libre. Par contre, quand on opère avec le jus des feuilles vertes du chou pommé, cueillies avant les premiers froids, on observe que la réaction violette s'intensifie lentement pour se stabiliser après 18 heures environ. L'intensité définitive de la réaction s'accorde avec les données obtenues par épreuve sur le cobaye.

La molécule C, ayant subi une modification entraînant la perte du pouvoir antiscorbutique, peut conserver intacte sa fonction diénolique. Dans ce cas, la réaction violette continue à se manifester, mais le potentiel d'oxydo-réduction prend une autre valeur.

Les déterminations de cette valeur ou, autrement dit, du pouvoir réducteur du diénol, permettent de se rendre compte si l'on se trouve en présence de la vitamine active ou de son produit de dégradation. Cela n'est possible, toutefois, qu'à condition d'avoir déterminé au préalable la concentration moléculaire du diénol dans le liquide éprouvé. Pour le faire, on recourt au dosage au réactif B qui vient d'être décrit. Opérant à des concentrations différentes en diénol, on mesure ensuite, à l'aide d'indicateurs ou par procédé électrométrique, le potentiel d'oxydo-réduction. La variation du potentiel,

exprimée en courbe, permet alors de préciser la nature du réducteur déjà partiellement caractérisée par la réaction violette.

La détermination du pouvoir réducteur

Nous examinerons en premier lieu la méthode basée sur l'emploi d'un indicateur de potentiel d'oxydo-réduction, le 2-6 dichlorphénol-indophénol. ZILVA (1927) mesura le premier le pouvoir réducteur des liquides antiscorbutiques d'après leur capacité de décolorer un phénol-indophénol. Estimant que le principe réducteur n'est point la vitamine C, il ne donne que peu de détails sur sa technique.

Par contre, TILLMANS et ses collaborateurs, qui utilisèrent à cet effet le 2-6 chlorphénol-indophénal, décrivent longuement toutes les variantes de leur procédé. (TILLMANS, 1930 et 1932, SIEBERT, 1931, P. HIRSCH, 1932, TILLMANS, P. HIRSCH et W. HIRSCH, 1932, et P. HIRSCH et JACKISCH, 1932, DICK, 1932, TILLMANS, P. HIRSCH et

Nous avons montré que le procédé utilisé par TILLMANS ne pouvait en principe permettre un dosage exact de la vitamine C [BEZSSONOFF et DELIRE, 1933 (1), (2)]. Les chiffres publiés par TILLMANS lui-même le confirment. Cet auteur indique que la dose journalière de vitamine C, strictement nécessaire au cobaye, réduit en moyenne de 6 à 12 cm^3 de colorant N. 10^{-3}. Ceci représente déjà un écart du simple au double, mais si l'on consulte le tableau qui figure dans le travail de TILLMANS, P. HIRSCH et JACKISCH (1932), on s'aperçoit que cet écart est constamment dépassé, les chiffres variant de 3 à 25 cm^3. Autrement dit, les teneurs en vitamine C,

déterminées par TILLMANS, peuvent être dix fois plus ou moins grandes que celles déduites par épreuves sur le cobaye.

Aussi croyons-nous inutile d'exposer en entier la méthode de TILLMANS. Toutefois, certaines opérations comprises dans sa technique se retrouvent, bien que modifiées, dans la nôtre. Elles concernent : 1° la préparation des liquides du dosage; 2° le contrôle du titre de la solution du 2-6 dichlorphénol-indophénol; 3° la détermination du volume de cette solution colorée par le liquide éprouvé.

Notre préparation des liquides de dosage fut décrite plus haut. Notons que TILLMANS a aussi recours, dans certains cas, à la défécation par l'acétate neutre de plomb, méthode de purification des liquides antiscorbutiques connue depuis longtemps (BEZSSONOFF, 1922, 1925). Soulignons qu'en règle générale, nous ajustons l'acidité des liquides soumis à l'épreuve au pH 3,5. Une telle acidité évite les pertes en vitamine C au cours de la défécation plombique et ralentit son oxydation. Nous avons préparé nos solutions de colorant en nous servant d'un produit de la maison SCHUCHARDT (Görlitz).

Il est difficile d'obtenir une dissolution complète du produit dans l'eau, aussi nous opérons comme suit:

200 mg. du colorant sont mis sur filtre taré. On verse ensuite sur ce filtre (par petites quantités) environ 400 cm^3 d'eau tiède (40° C.) distillée sur permanganate. On détermine après dessication le poids du colorant resté sur le filtre et on complète la solution par de l'eau bidistillée de façon à obtenir une concentration égale à 290 mg. de colorant sur un litre. Le poids moléculaire du 2-6 dichlorphénol-indophénol ($C_{12}H_6NO_2Cl$ Na) étant

290, cette solution devrait être 10^{-3}N. Mais le produit étant instable et pouvant contenir des impuretés, il est nécessaire de vérifier son titre.

Nous avons utilisé, à cet effet, le procédé employé par DICK (1932). Dans une fiole conique fermant à l'émeri, on introduit 60 cm^3 d'une solution d'acide sulfurique à 1 % volumétrique et 3 cm^3 d'une solution de K I à 10 % en poids. On ajoute ensuite 10 cm^3 de la solution du colorant. On bouche la fiole et on attend dix minutes environ en la remuant. La solution vire complètement au jaune. L'iode, dégagé par suite de l'addition du colorant, est alors titré par une solution d'hyposulfite N/400 en présence d'un centimètre cube d'une solution d'amidon de 0,5 %. Le titre de la solution d'hyposulfite est vérifié avant et après cette mesure.

D'après les déterminations faites par trois observateurs différents, une molécule du colorant exige 1,19, 1,20, 1,21 et 1,20 d'hyposulfite. La valeur correspondante calculée en se basant sur les données de DICK est 1,20. Ce rapport exprime un état d'équilibre qui s'établit dans les conditions imposées par ce dosage entre le I_2, le K I, le colorant et sa leucobase. Aussi le procédé iodométrique ne peut par lui-même indiquer la teneur du dichlorphénol-indophénol dans la solution. Mais il permet de s'assurer si cette teneur est toujours la même et, par conséquent, si les mesures sont faites en conditions identiques.

Nous avons employé, en plus, un autre procédé de vérification du titre de la solution du dichlorphénol-indophénol. Il consiste à déterminer les quantités de la solution du colorant réduite par un volume donné d'une

solution d'hydroquinol (pH 3,5) éprouvé en concentrations diverses.

Précisons maintenant la façon de mesurer la quantité de l'indicateur décolorée par le liquide soumis à l'épreuve.

D'après TILLMANS, c'est la quantité nécessaire pour obtenir une coloration juste reconnaissable. Il spécifie toutefois que la couleur de la teinte doit être nette (TILLMANS, 1930, TILLMANS, P. HIRSCH et W HIRSCH, 1932). Or, la marge entre cette quantité et celle déjà suffisante pour provoquer une teinte quelconque, encore indéfinissable, est grande.

DICK (1932) estime que la coloration faible mais nette doit égaler celle qu'on obtient en introduisant 0,2 cm^3 de colorant dans environ 20 cm^3 d'un liquide témoin non réducteur. Or, après avoir versé goutte à goutte dans la solution réductrice 0,1 cm^3 de colorant et noté l'apparition d'une teinte persistante, mais à peine visible, on doit, pour obtenir celle qu'indique DICK, ajouter encore non pas 0,2, mais 0,5 cm^3 et plus de colorant, car une partie seulement de l'indicateur nouvellement introduit renforce la teinte, l'autre continue à se décolorer. Par conséquent, la marge occupée par la fin de la titration dépasse de beaucoup celle qui revient à la titration même; plus grande est cette marge, plus grande est l'erreur qu'affecte la détermination.

Nous avons cherché à la réduire en opérant de la manière suivante:

Premier cas. — Le liquide éprouvé est incolore. A l'aide d'un microburette graduée à 0,02 cm^3, on verse le colorant dans un tube calibré contenant 10 cm^3 ou

20 cm^3 de la solution réductrice. Deux tubes exactement pareils au premier servant de témoin. L'un est rempli d'eau, l'autre de la solution tampon pH 3,5 teintée par addition de 0,01 cm^3 de colorant par 10 cm^3 de liquide. On ne distingue cette coloration que si on regarde le tube en profondeur par comparaison avec un tube rempli d'eau. Le colorant est versé goutte à goutte dans la solution réductrice. Si l'on opère avec 10 cm^3 de la solution, on répartit le colorant en impliquant un mouvement rotatif au tube légèrement incliné. Opérant avec 20 cm^3, on remue le liquide avec une baguette en verre aplatie au bout. Vers la fin de la titration, la coloration ne disparaît complètement qu'après deux à trois minutes d'attente. On s'en assure par comparaison avec le tube témoin rempli d'eau. A un moment donné, l'addition de 0,01 à 0,02 cm^3 de colorant détermine l'apparition d'une teinte stable ne disparaissant pas après dix minutes d'attente. Cette teinte doit être juste perceptible, son inensité étant inférieure à celle du tube témoin coloré. Supposons qu'on a opéré avec 10 cm^3 de solution réductrice et que la quantité de colorant utilisé a été 0,51 cm^3. En déduisant la quantité du colorant introduit dans le deuxième tube témoin, soit 0,01 cm^3, on obtient 0,51 — 0,01 = 0,5 cm^3. C'est ce chiffre que nous prenons comme mesure du pouvoir décolorant de 10 cm^3 de la solution éprouvée.

Deuxième cas. — Epreuve d'un liquide coloré. La défécation peut parfois laisser subsister une légère teinte jaune du liquide éprouvé. Ceci nécessite de doubler la marge occupée par la fin de la titration et de recourir à des solutions témoins colorées de même que le liquide expérimenté. Le premier tube témoin contiendra

la solution éprouvée elle-même non additionnée de colorant. On apprête le deuxième témoin en introduisant quelques gouttes de rouge de méthyle dans de l'eau acidifiée ou alcalinisée au besoin de façon à obtenir une coloration exactement semblable à celle de la solution expérimentée. On ajoute ensuite 0,02 cm^3 de dichlorphénol-indophénol par 10 cm^3 de cette solution témoin. La fin de la titration est marquée par l'apparition d'une teinte à peine visible, mais persistante. On s'assure de son existence par comparaison avec le premier tube témoin. Son intensité est inférieure à celle de la teinte du deuxième tube témoin. *On ne cherche jamais à obtenir une teinte exactement égale à celle du témoin.* Le chiffre lu à la burette est corrigé cette fois en déduisant non pas 0,01, mais 0,02 cm^3. Si l'on opère avec des liquides non déféqués dont la coloration propre peut être forte, il y a avantage à recourir alors au procédé indiqué par SIEBERT (1932). Il se base sur le fait que les pigments présents dans les solutions éprouvées ne diffusent pas dans le nitrobenzol et que le diphénol-indophénol est par contre sélectivement absorbé par ce solvant. SIEBERT introduit dans un tube à centrifuger de 1,5 cm^3 de diamètre 5 cm^3 de nitrobenzal et 3 cm^3 de la solution éprouvée rendue légèrement acide. On introduit le colorant et on le répartit dans le liquide réducteur en agitant avec prudence le tube. La couleur propre, jaune-verte, du nitrobenzol prend d'abord une nuance orange. D'après SIEBERT, la teinte orange devient nette après addition de 0,2 cm^3 de colorant en plus.

Les déterminations du potentiel

Nous opérons toujours en présence de l'air atmosphérique. De ce fait, l'âge de la solution éprouvée est un facteur très important. Dans le cas de substances aussi instables que l'acide ascorbique, le réductone, la cystéine, le pyrogallol, les mesures au potentiomètre doivent commencer 20 à 30 minutes après la mise en solution, et ne durer pas plus qu'une heure quarante minutes. Si l'on désire les étendre à une autre région, on prépare une solution nouvelle. La détermination d'un potentiel isolé ne doit pas durer plus de 25 minutes. Si le potentiel tarde à s'établir, on passe à la détermination suivante et reprend ensuite les mesures avec une solution fraîchement préparée. Le potentiel se stabilise rapidement quand on a fait subir à l'électrode de platine, avant de commencer une série de mesures, le traitement suivant: l'électrode de platine est passée à la flamme et ensuite plongée, encore chaude, dans du mercure. Ceci peut être mis en rapport avec la propriété bien connue des électrodes de mercure de permettre une stabilisation rapide du potentiel.

La composition du tampon peut exercer une grande influence sur la précision des mesures. Elle se manifeste d'une façon particulièrement nette quand on opère avec des substances pures. La présence d'acétate de soude et d'acide acétique rend les mesures très difficiles. Le tampon citrate de soude, acide citrique assure des résultats meilleurs. Ils deviennent excellents et permettent d'atteindre une précision voisine de 1 m. v. quand on utilise un tampon composé de phosphate de soude et

d'acide phosphorique purs. Nous avons purifié le phosphate bisodique « pour analyse » Rhône-Poulenc en le soumettant à deux recristallisations dans l'eau, suivies d'une cristallisation dans l'alcool et ensuite d'une cristallisation dans l'eau. L'acide phosphorique utilisé était fourni par MERCK sous appellation « Acide phosphorique liquide tout pur D 1.35 ». A titre d'exemple, indiquons la préparation de notre tampon pH 3,5: 1° solution d'acide phosphorique à 10 % volumétrique dans de l'eau bidistillée; 2° solution de phosphate bisodique à 10 % en poids dans de l'eau bidistillée; 100 volumes de la première solution sont mélangés avec 109 volumes de la deuxième.

Les mesures du potentiel des liquides biologiques sont plus difficiles que celles des solutions pures. Pour obtenir une courbe satisfaisante, il est souvent nécessaire de les répéter à plusieurs reprises. Les chiffres en m. v. portés sur l'ordonnée de nos courbes sont obtenus en ajoutant à la valeur lue au potentiomètre une correction de + 250 m. v. à la température 18-20° C. et de + 246 m. v. aux températures 25° et 30° C.

Les possibilités d'un dosage spectrophotométrique de la vitamine C.

Les premières données concernant l'absorption du rayonnement ultra-violet par la solution de la vitamine C (COX, HIRST et REYNOLDS, 1932) paraissaient indiquer une absorption bien caractérisée avec un maximum à 265 μ. Cependant, MICHEEL et KRAFT [1933 (2)] ont, par la suite, démontré que l'absorption de la vitamine C dans l'ultra-violet n'obéit pas toujours à la loi de BEER-

LAMBERT. Les sommets des courbes d'absorption des solutions alcooliques 116 10^{-5}N et 49 10^{-5}N varient, en effet, avec la concentration de la vitamine, se situant respectivement à 252 et 256 μ.

Si le phénomène constaté par MICHEEL se reproduit également en solution aqueuse, le problème du dosage spectrophotométrique de la vitamine C s'en trouverait singulièrement compliqué. Tout en étant moins grandes, les difficultés liées avec ce genre de dosage subsisteraient encore si même l'absorption des solutions aqueuses de la vitamine C se conforme à la loi de BEER-LAMBERT. En effet, la région spectrale correspondant à la longueur d'onde 265 μ est très peuplée. Les sommets des bandes d'absorption maximum qui caractérisent plusieurs composés fréquents dans les milieux biologiques, tels l'uracil et la vitamine B^1, s'y trouvent situés. De plus, une bande d'absorption, si bien exprimée soit-elle, ne caractérise qu'un groupement atomique déterminé. Les raisons qui limitent la valeur d'une réaction colorée comme indice spécifique d'une molécule doivent donc valoir aussi dans ce cas, Les travaux des dernières années, consacrés à la vérification des données du dosage spectrophotométrique de la vitamine A, en apportant d'ailleurs des preuves concrètes.

Détermination de la teneur en vitamine C des végétaux

Le jus de citron

Dans la majorité des cas, le dosage au réactif B indique une teneur de 352 U. H., par conséquent une concentration en réducteur diénolique de 352 10^{-5}N. Exceptionnellement, on détermina une valeur minimum de

320 U. H., fruit fané en fin de saison, et une valeur maximum de 370 U. H. Calculé d'après la valeur de 352 U. H., la teneur en acide ascorbique de 1 cm^3 de jus de citron égale 176 mg. $352.10^{-5} = 0{,}62$ mg. Les épreuves sur cobaye indiquent pour cette teneur des chiffres de 0,6 à 0,66 mg., donc en moyenne 0,63 mg.

Ainsi, d'après DEMOLE (1933), l'effet sur des cobayes soumis à son régime scorbutigène, d'une dose de 1 mg. d'acide ascorbique par animal et par jour, était, au cours de toute l'épreuve, sensiblement pareil à celui qui détermine l'addition à ce régime de 1,5 cm^3 de jus de citron. BIRCH, HARRIS et RAY (1933) précisent que l'effet sur cobaye de 1,5 cm^3 de jus de citron équivaut à celui de 0,9 à 1 mg. d'acide ascorbique pur. Ces auteurs ont, d'autre part, titré au dichlorphénol-indophénol comparativement une solution d'acide ascorbique pure et de jus de citron *convenablement dilué*. Ils déterminent ainsi que 1 cm^3 de jus contient de 0,6 à 0,62 mg. de vitamine C.

Le suc de chou

La même variété de chou pommé vert a servi à toutes nos épreuves. Les déterminations faites en juillet et jusqu'à la fin septembre ont indiqué une teneur apparente en diénol variant de 363 à 387 U. H., donc très voisine de celle du jus de citron. Cependant, ce même suc, mis en tube sous l'huile de paraffine et chauffé pendant cinq minutes au bain-marie, refroidi et éprouvé au réactif, accusait une augmentation de l'intensité de la réaction de 25 % environ. Le suc non chauffé additionné de réactif et mis en observation pendant dix heu-

res, accusait une intensification de 50 %. Nos déterminations ont été reprises après les premières gelées le 20 octobre et les jours suivants; ils indiquèrent, cette fois, immédiatement, une teneur en diénol du suc de chou variant de 528 à 484 U. H. Celle du jus de citron étant de 352 U. H., le rapport entre la teneur en vitamine C et de ces sucs est donc voisin le 1,5 : 1. Ce même rapport se laissait déduire des expériences déjà anciennes faites sur des cobayes par CHICK, RODES et DELF (1924 et 1925). Il fut confirmé par des épreuves faites en utilisant un régime scorbutigène strict [BEZSSONOFF, 1927, 1928 (2)]. Ces épreuves démontrèrent que l'action d'une dose de 0,75 à 0,8 cm^3 de jus de citron par 100 grammes de cobaye égale celle d'une dose de 0,5 à 0,6 gr. de chou vert.

Le suc de tomate

On utilisa des tomates mûres et en parfait état de conservation. La teneur en diénol, déterminée au réactif B, variait de 108 à 225 U. H. D'après ce dosage, le rapport de la teneur en vitamine C dans le jus de citron et le suc de tomate serait de 3 à 1.

DELF (1924 et 1925) a éprouvé sur des cobayes l'action de suc de tomate, utilisant le régime scorbutigène de CHICK et HUME. D'après ses données, la teneur en vitamine C de ce suc, assez constante quand les tomates sont de même provenance, varie beaucoup quand les tomates ont été cultivées sous différents climats.

Suivant le cas, le jus de citron se révélait de 1,5 à 4 fois plus riche en vitamine C que le suc de tomate. Nous remercions M^me^ RANDOIN pour l'aimable autorisa-

tion d'utiliser ses données non publiées concernant l'épreuve sur les cobayes du jus de citron et du suc de tomate, frais et conservé, par le procédé MATZKA (MARSAIS et GAVOTY, 1932). Les doses de 5 cm^3 de suc de tomate et de 2 cm^3 de jus de citron frais ont préservé les cobayes, au cours d'une expérience de trois mois, et déterminé une augmentation du poids initial de 29 et 31 %.

Le rapport 3 déterminé par nous entre la teneur en vitamine C du jus de citron et du suc de tomate se trouve ainsi confirmé.

Le suc de tomate conservé

Quatre échantillons de suc de tomate conservé par le procédé de MATZKA, éprouvés au réactif B, accusèrent les teneurs suivantes en réducteur diénolique: 77, 77, 66 et 44 U. H., en moyenne 66 U. H. La courbe de titration, obtenue à l'aide du dichlorphénol-indophénol et basé sur le dosage du diénol, se révéla exactement pareille à la courbe du suc de tomate frais. La conservation n'avait donc déterminé qu'une perte de 40 % en moyenne de la teneur initiale du suc en vitamine C. Il est remarquable que, dans ce cas, n'apparut aucun produit d'évolution de la vitamine C, ayant conservé la fonction diénolique.

L'épreuve sur les cobayes faite par M^me^ RANDOIN indiquait pour la dose de 6 cm^3 du suc conservé une légère augmentation du poids initial à la fin de l'expérience. Elle atteignit 11 % contre 29 % constatée à l'épreuve de la dose de 6 cm^3 de suc frais, faite simultanément. L'action d'une dose de 4 cm^3 de suc conservé se traduit

sant par une perte en poids de 14 %. Les cobayes éprouvés au suc conservé étaient plus jeunes (poids initial moyen 445 grammes) que ceux qui absorbaient le suc frais (poids initial 570 grammes). Par conséquent, la diminution du gain en poids, sans être grande, est nettement accusée. Les données, fournies par l'épreuve sur animaux du jus conservé, sont insuffisantes pour établir une comparaison quantitative exacte avec les résultats de nos dosages. On conviendra néanmoins que le sens des indications obtenues par les deux méthodes est le même.

La teneur en vitamine C du jus de choucroute fraîchement extrait

Les opinions émises dans la littérature sur la valeur antiscorbutique de la choucroute sont contradictoires et ne reposent souvent sur aucune preuve directe. Les seules données précises que nous connaissons à ce sujet sont celles de WEDGEWOOD et FORD (1924), CLOW, MARLAT, PETERSON et MARTIN (1929), PARSON et HORN (1933), et IVANOFF (1933). Les premiers éprouvèrent sur des cobayes un jus de choucroute conservé pendant trois semaines au froid; ce jus donnait la réaction bleue, mais était privé d'action antiscorbutique. Cependont, CLOW a montré que la choucroute peut contenir de la vitamine C active dont la teneur varie selon le mode de préparation et conservation; les données de PARSON et IVANOFF confirment ces conclusions. Nos dosages préalables du jus de choucroute frais et conservé indiquent que sa teneur en vitamine C active est très variable. On obtenait des courbes de variation du potentiel se disposant entre celles des jus antiscorbutiques frais et de

l'acide ascorbique et une courbe en plateau nettement différente.

Il était évident que, dans le jus de choucroute, la vitamine C évoluait en une substance diénolique qui, provoquant la réaction violette, pouvait être dépourvue d'action antiscorbutique. Toujours très irrégulière, cette transformation s'intensifiait au cours de la conservation du jus. Pouvoir doser le diénol actif, présent en mélange avec le diénol privé d'action, au sein d'un tissu végétal en décomposition, nous paraissait devoir constituer une épreuve démonstrative de la valeur du procédé. Le contrôle d'un tel dosage nécessitait un test sur cobaye particulièrement précis.

Voici comment nous avons procédé :

Dix cobayes, dont le poids individuel variait entre 200 et 300 grammes, furent divisés en deux lots. Le cobaye le plus faible de chaque lot fut exclu au cours de l'épreuve. Les lots définitifs, composés de quatre animaux chacun, pesaient au début de l'épreuve 1.050 gr. le premier et 1.035 gr. le deuxième. On utilisa comme régime de base le régime scorbutigène BEZSSONOFF modifié : mélange de 80 parties en poids d'avoine (graines), 8 de son et 4 de levure fraîche, paille et eau à volonté. En plus, on administrait en solution dans l'huile d'olive 0,004 mg. d'ergostérol irradié et 0,02 mg. de carotène par 100 grammes de cobaye. Cette solution était obtenue par mélange des préparations commerciales « Irrastérine » et « Amunine » Byla. La teneur de l'Amunine en carotène non décomposée fut vérifiée colorimétriquement (BEZSSONOFF, 1929) et trouvée égale à 0,43 mg. par 1 cm^3. L'ergostérol étant administré en grand excès, la

teneur de l'Irrastérine en produits actifs ne fut pas contrôlée.

Le début de l'épreuve date du 11 novembre. Le premier lot absorbait la vitamine C sous forme de jus de choucroute fraîchement extrait, le deuxième lot sous forme de jus de citron. Les jus étaient introduits par la bouche à l'aide d'une seringue en verre. Notre réserve de choucroute, 10 kilos, était conservée à la température de + 5° C.; elle fut renouvelée au vingtième jour de l'épreuve. A partir du quinzième jour, la choucroute fut recouverte de grosses pierres, ceci diminua les variations de la teneur en vitamine C dans le jus que nous en exprimions. Chaque jour, immédiatement après son extraction, le jus de choucroute était administré aux cobayes et soumis au dosage de la vitamine C. On commençait par déterminer à l'aide de la réaction violette la teneur du jus en réducteur diénolique. Ensuite, en utilisant le dichlorphénol-indophénal, on obtenait une courbe de titration qui devait caractériser ce réducteur. La courbe obtenue pouvait:

1° correspondre de près à celle du jus antiscorbutique frais;

2° différer nettement de celle-ci se présentant en plateau;

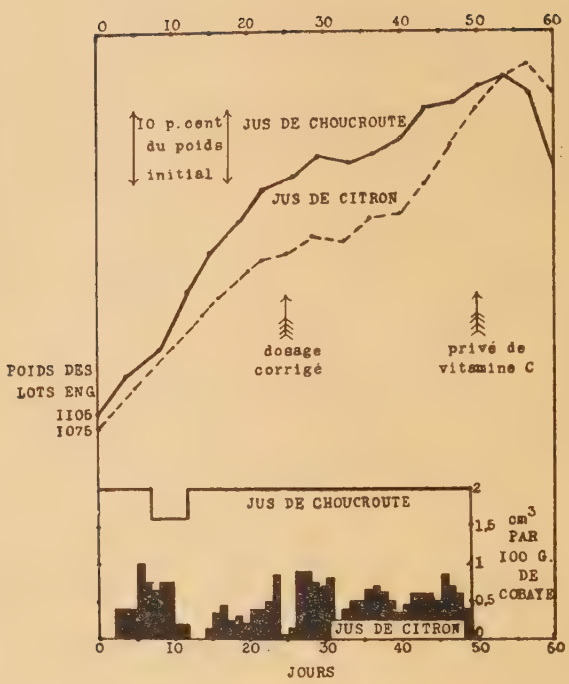
3° occuper une position intermédiaire.

Dans le premier cas, on estimait que le réducteur diénolique, mis en évidence par la réaction violette, correspondait en entier à la vitamine C. Dans le deuxième cas, on concluait à l'absence complète de vitamine. Enfin, quand la position de la courbe était intermédiaire, on déterminait la teneur du jus en vitamine active de la

façon suivante: on notait les concentrations qui correspondaient au croisement de la courbe obtenue et de la courbe de l'acide ascorbique avec un trait horizontal. On divisait ensuite le nombre des U. H. déterminés à l'aide de la réaction violette par le rapport des deux concentrations. Exemple: la concentration en diénol du suc de choucroute étant 7 N10-^{5}, la quantité de colorant réduite correspondait à celle réduite par la solution 12 N10-^{5} 12: 7 = 1,7, 7: 1,7 = 4. Donc, sur 7 parties de diénol de la choucroute, 4 seulement étaient constituées par l'acide ascorbique.

Après avoir déterminé la concentration en vitamine C du jus de choucroute, on calculait la dose du jus de citron contenant une quantité équivalente en vitamine C et on l'administrait aux animaux du deuxième lot.

Dans de nombreux cas, la réaction diénolique donnée par le jus n'atteignait son maximum d'intensité qu'après huit à dix heures d'attente. Ce phénomène, analogue à celui observé dans le cas du jus de chou frais, devait correspondre à l'hydrolyse de la forme combinée de l'acide ascorbique. On pouvait donc s'attendre à ce que la concentration en diénol, déterminée immédiatement après addition du réactif B, soit au-dessous de la concentration réelle. Afin de le certifier, nous avons, au cours des 25 premiers jours, calculé la dose de jus de citron du lot de contrôle nous basant sur la détermination faite immédiatement. L'expérience sur les animaux montre nettement une erreur en moins (graphique II).



A partir du 26e jour, la dose de jus de citron fut calculée comme suit :

1° On dosait au réactif B le jus de choucroute immédiatement après son extraction et on déterminait la teneur en vitamine C active comme indiqué plus haut.

2° Les tubes contenant le jus de choucroute + le réactif B étaient conservés à la température de 20° C. et on procédait à une nouvelle mesure après 18 heures, l'intensité de la réaction ayant atteint son maximum. La première détermination accusait, par exemple, une

teneur en diénol du jus égale à 100 N10-^{5} ou 100 U. H., et la deuxième 140 U. H. La différence, soit 40 U. H., devait correspondre à la fraction de la vitamine C active présente au début sous forme combinée. On augmentait donc autant la dose du jus de citron au lot de contrôle. Si les cobayes du premier lot absorbaient 2 cm^3 de jus de choucroute, la dose de complément égalait donc deux fois 40 = 80 U. H. Un centimètre cube de jus de citron contenait 320 U. H. Par conséquent, la dose en jus de citron était augmentée de 0,25 cm^3 par 100 grammes de cobaye du deuxième lot.

L'erreur en plus qui se manifeste après la correction du dosage (voir graphique II) est de beaucoup moindre que l'erreur en moins qui apparaissait avant la correction.

La précision du dosage s'approche de la précision du test sur cobaye.

DÉTERMINATION DU RÉDUCTEUR DIONÉLIQUE DANS LES URINES, LE LAIT ET LE CRISTALLIN

Les Urines (1)

WOLLMANN (BEZSSONOFF, 1922) a signalé le premier que l'urine d'un cobaye qui absorbe une nourriture riche en vitamine C provoque la réaction violette de BEZSSO-

(1) L'étude systématique du comportement des urines par rapport à l'acide monomolybdo-phospho-tungstique a été entreprise sur la suggestion de M. le Professeur ROHMER. Les données que nous reproduisons ici à titre d'exemple font partie d'un ensemble de recherches destinées à être publiées autre part.

NOFF. Elle cesse de se produire dès que le régime devient scorbutigène. Nous pûmes ensuite confirmer ces données concernant le cobaye (BEZSSONOFF, 1928). Le lien entre l'apparition de la réaction violette dans l'urine des femmes et la teneur de vitamine C de leur nourriture fut notée par CANEGALY (1924) et étudié chez le nourrisson sur un grand nombre de cas par KATZ (1933). En résumé, l'urine d'un sujet sain, pourvu de vitamine C en quantité suffisante, provoque normalement la réaction violette. Nous avons pu nous convaincre qu'elle possède également un pouvoir décolorant très caractéristique vis-à-vis du dichlorphénol-indophénol. Le réducteur diénolique qui détermine la réaction violette de l'urine est aussi bien la vitamine C que ses produits d'évolution. La présence de la vitamine C dans les urines fut indiquée par BEZSSONOFF et DELIRE (1933) qui se basaient sur l'épreuve au réactif B et sur les mesures de la variation du potentiel. VAN EEKELEN, EMMERIC, JOSEPHY et WOLF (1934) ont démontré l'action antiscorbutique sur le cobaye de l'urine d'un homme qui absorbait des oranges en grande quantité.

Mentionnons enfin les curieuses observations de VALDMANN (1931 et 1934) selon lesquelles l'urine des oiseaux et des rats, nourris avec des graines entières, donne la réaction violette qui cesse d'apparaître après quelques jours de régime au riz glacé. L'enveloppe des graines, étant privée de vitamine C et ne donnant pas la réaction violette, devrait donc contenir la provitamine C encore inconnue.

Ayant observé que l'urine des cobayes, qui absorbent une alimentation antiscorbutique, provoque la réaction violette, WOLLMANN (BEZSSONOFF, 1922) éprouva son ef-

fet sur d'autres cobayes, soumis au régime scorbutigène. L'urine qu'il utilisa dans ses expériences provenait d'animaux, absorbant à volonté eau, herbe fraîche et avoine. Administrée à une dose de 5 cm^3 par animal et par jour, elle ne montra aucune action antiscorbutique. A l'aide de notre technique actuelle, nous avons pu préciser la concentration en diénol de l'urine des cobayes soumis au même régime que celui qu'utilisa WOLLMANN. Elle ne dépasse pas 13.10^{-5} N ou 13 U. H. Admettant que le diénol présent dans cette urine était l'acide ascorbique, la dose de 5 cm^3 ne pouvait en contenir que $5.176.13.10^{-5}$ N = 0,11 mg. Cette quantité, égalant un dixième environ de la dose en vitamine C nécessaire au cobaye, son action ne pouvait être aperçue (1). Aussi les données de WOLLMANN n'autorisaient aucune conclusion quant à la nature du diénol contenu dans l'urine. Privant les cobayes d'eau, nous leur avons offert à volonté des feuilles vertes de chou et de l'avoine humectée. Les feuilles flétries étaient retirées et remplacées par des fraîches quatre fois au cours d'une journée. L'urine obtenue dans ces conditions dosait 28 U. H. (28.10^{-5} N) en réducteur diénolique. Cette teneur, encore insuffisante pour tenter une épreuve directe de l'action du diénol sur les cobayes, nous permit de le caractériser à l'aide d'une courbe colorimétrique.

Cette courbe voisine celle du diénol contenu dans le jus de citron. Les courbes obtenues en opérant avec des urines d'enfants, d'un homme et d'un cheval, se situent de même.

L'épreuve de l'urine de la petite Dcr. (9 ans) révéla

---

(1) Ceci vient d'être confirmé par les dernières expériences de Mme RANDOIN (1934).

un phénomène exceptionnel. La réaction bleue s'intensifiait graduellement pour se stabiliser seulement douze heures après l'addition du réactif B. Un cas analogue ne fut observé qu'on opérant avec les sucs de chou et de choucroute. Il doit correspondre à l'hydrolyse d'une forme combinée de l'acide ascorbique. La courbe obtenue se rapprocha exactement de celle de l'acide ascorbique.

Les courbes précitées furent obtenues à l'aide du dichlorphénol-indophénol. Nos tentatives de titrer électrométriquement les urines non déféquées nous indiquèrent des valeurs de potentiel qui étaient de 130 à 170 m. v. plus basses que celles induites par l'acide ascorbique éprouvé aux mêmes concentrations. La défécation de l'urine à l'acétate de plomb ramena cette différence à 30 à 50 m. v. environ. L'épreuve des urines au nitroprussiate de soude montra que la défécation à l'acétate de plomb n'éliminait pas complètement les composés sulfhydrilés. Signalons enfin que le diénol présent dans quelques urines de nourrissons se caractérisait par une courbe colorimétrique en plateau nettement distincte de celle de l'acide ascorbique et dénotant un pouvoir réducteur beaucoup plus faible. Une courbe semblable fut obtenue par deux fois opérant avec l'urine d'un cheval. Deux autres épreuves faites sur l'urine du même cheval permirent d'établir des courbes qui correspondaient exactement à celle de l'acide ascorbique. Dans les quatre cas, la teneur en réducteur diénolique de l'urine du cheval se révéla sensiblement la même, 28 U. H. environ. Les épreuves eurent lieu en mars, le cheval, un étalon, était nourri de foin et d'avoine.

Le rapport du diénol excrété dans l'urine à la vitamine C absorbée dans la nourriture

Ce rapport fut déterminé en expérimentant sur trois jeunes gens et un lot de quatre cobayes. Nous indiquons les quantités du diénol en U. H., en rappelant que l'U. H. correspond à la teneur en diénol de 1 cm^3 N10^{-5}. Les quatre cobayes soumis au régime précité, donc privés d'eau, absorbèrent en 24 heures 288 grammes de chou vert. Le poids initial du lot, 2.765 grammes, atteignit en 24 heures 2.820 grammes. Le chou absorbé apporta par conséquent à chaque cobaye la valeur d'environ 20 doses antiscorbutiques strictement suffisantes. La teneur en diénol du chou était de 484 U. H. par gramme, sa quantité totale absorbée par le cobaye égalait donc: 288.484 = 138.492 U. H. L'urine récoltée, 77 cm^3, dosant 29 U. H., par 1 cm^3, les eaux de lavage du collecteur, 100 cm^3, dosant 4,4 U. H. par centimètre cube, la quantité du diénol excrété égalait donc: 77.29 + 100.4,4 = 2673 U. H. ou 1,9 % de la quantité absorbée.

Les jeunes gens, objets de nos expériences, se soumirent à un régime de base strictement scorbutigène: œufs, pâtes, jambon, pain. La vitamine C fut absorbée sous forme de tomate crue et de jus de citron. La dose en vitamine C suffisante à l'homme est estimée être égale au quart (à 1/4) de la dose nécessaire au cobaye. Exemple: par kilogramme de cobaye, il faut 7,5 cm^3 de jus de citron et, par kilogramme d'homme, environ 2 cm^3, soit 1,2 mg. d'acide ascorbique. L'âge et le poids des trois sujets: K., 25 ans, 62 kilos; St., 25 ans, 70 kilos; Sch., 29 ans, 78 kilos.

K. et St. souffraient de malaises légers, la santé de Sch. était parfaite. Chiffres se rapportant à l'absorption en 24 heures de 0,4 de la dose antiscorbutique suffisante : sujet St., diénol absorbé 60 cm³ de jus de citron, dosant 352 U. H. par 1 cm³, 60.352 = 21,120 U. H. Diénol excrété 1.100 cm³ d'urine, dosant 7,7 U. H. par 1 cm³, donc 1100.7,7 = 8470 U. H. ou 40 % de la quantité introduite. Sujet K., diénol absorbé 50 cm³ de jus de citron dosant 330 U. H.; 50.330 = 16.500 U. H. Diénol excrété : 800 cm³ d'urine dosant 9 U. H.; 800.9 = 7200 U. H., soit 43 %.

Diénol absorbé : 145 gr. de tomate dosant 110 U. H. par 1 gramme; 145.110 = 15.950 U. H. Diénol excrété : 1365 cm³ d'urine, dosant 6,6 U. H. par 1 cm³, 1365.6,6 = 9009 U. H., soit 56 %.

Sujet Sch. Jus de citron 63 cm³ dosant 352 U. H. 63.352 = 22.176 U. H. Urines 1540 cm³ dosant 11 U. H., 16.940 U. H., soit 76 %.

Absorption de 1,2 dose antiscorbutique.

Sujet K. Jus de citron 148 cm³ dosant 343 U. H., 148.343 = 50.764 U. H. Urine 800 cm³ dosant 46 U. H.; 800.46 = 46.800 U. H.; excrété 72 %.

Le lait

L'objet principal de notre étude fut le lait que fournit une grande entreprise locale. Elle réunit journalièrement dans un mélange commun environ 50.000 litres de lait. La teneur moyenne en vitamine C d'une quantité de lait aussi importante nous semblait devoir être peu influencée par des facteurs accidentels. D'autre part,

l'action antiscorbutique de ce lait, que nous désignons lait Cr, venait d'être étudiée sur cobayes par M^me^ DOMANSKA (1933). Les expériences de M^me^ DOMANSKA eurent comme base le principe d'administrer au cobaye la vitamine C uniquement sous forme de lait. Or, au cours de ces dernières années, différents auteurs se sont opposés avec raison à la possibilité d'appliquer ce principe dans le cas très particulier de dosage biologique de la vitamine C dans le lait. En effet, il est impossible, dans ce cas, d'expérimenter avec des doses variables et suffisamment grandes, car le besoin du cobaye en vitamine C est exceptionnellement important et le lait dont la teneur en vitamine C est minime, possède une haute valeur nutritive.

Nous avons donc entrepris, en collaboration avec M^me^ DOMANSKA, une nouvelle série d'épreuves, basées sur le principe suivant:

On administre au cobaye une substance dont le titre en vitamine C est connu, en quantité correspondant à la moitié de la dose nécessaire. On complète la dose en ajoutant à la ration une quantité déterminée de lait. L'effet sur la croissance du cobaye, obtenu à l'aide de la dose combinée, est comparé à celui produit par une dose entière de la substance antiscorbutique connue. Comme substance servant de terme de comparaison, nous avons choisi le chou vert. La moitié de la dose, couvrant entièrement le besoin du cobaye en vitamine C, est contenu dans 0,3 gr. de chou par 100 grammes de cobaye. Les observations préalables de M^me^ DOMANSKA nous facilitèrent le choix de la quantité de lait donné en complément. Le lait cru et le lait bouilli furent éprouvés parallèlement. On utilisa des lots de quatre cobayes. Le poids

initial des cobayes variait entre 430 et 450 grammes. Leur régime de base était celui de BEZSSONOFF modifié (voir l'épreuve du jus de chaucroute). On s'assura que les aliments antiscorbutiques, chou et lait, ajoutés au régime, étaient complètement absorbés par les animaux. L'expérience dura 85 jours, du 7 mai au 28 juillet, dernier jour de l'épreuve. Le lot auquel on administrait en plus de 0,3 gr. de chou 6 cm^3 de lait Cr cru par 100 gr. de cobaye marqua une augmentation du poids initial de 42 %. L'effet d'une dose antiscorbutique semblable, mais comprenant du lait bouilli, se traduisit par une augmentation de 25 %.

Dans le premier cas, l'augmentation est voisine et, dans le deuxième, supérieure à celles que provoquent respectivement les doses de 0,6 et 0,5 gr. de chou vert et qui sont en moyenne de 38 et 5 %. Donc, 6 cm^3 de lait Cr cru et 0,3 de chou vert contenaient une quantité approximativement égale en vitamine C. La concentration moyenne du diénol dans le suc de chou était de 495 U. H. par 1 cm^3. Les tissus du chou renferment environ 10 % (9,9) de substance sèche, par conséquent 0,3 gr. de chou contient en diénol 0,3.495.0,9 = 133 U. H. et sa teneur dans le lait Cr cru égale donc: 133: 6 = 22 U. H. ou 22 $N10^{-5}$ par 1 cm^3. Calculé en acide ascorbutique, ceci correspond à une teneur de 38 mg. par litre de lait. La perte en vitamine due à l'ébullition est au-dessous de 33 %.

Retardé par l'élaboration de la technique, nous n'avons pu procéder aux premières déterminations de la teneur en diénol du lait Cr que vers le 15 novembre. Elle se révéla égale à 16 U. H. au lieu de 22 U. H. indiqués par l'épreuve sur animaux. La différence entre la nour-

riture des vaches en été et en novembre justifie cet abaissement du titre de la vitamine C dans le lait. Dosée au réactif B, la perte en vitamine C, due à l'ébullition du lait, apparaissait être de 16 % en moyenne.

La vérification du dosage au réactif B par mesure du pouvoir réducteur semble inutile quand on opère avec du lait cru, mais elle s'impose quand on détermine la teneur en vitamine C active des laits chauffés et conservés.

Le cristallin

NORDMANN et VAN WIEN (1934), appliquant notre procédé, ont dosé la teneur en vitamine C du cristallin de l'homme, du lapin et du bœuf. Le cristallin de l'homme en contient de 0,011 à 0,016 mg., celui du lapin de 0,016 à 0,026 mg. La teneur par gramme de cristallin de bœuf est de 0,25 mg. Ces chiffres sont nettement inférieurs à ceux des auteurs qui se contentèrent d'une titration directe au phénol-indophénol d'après TILLMANS. La courbe colorimétrique obtenue par NORDMANN et VAN WIEN accuse une concordance satisfaisante avec celle de l'acide ascorbique. Par contre, les mesures électrométriques, de même que dans le cas de l'urine, indiquèrent des valeurs de potentiel beaucoup trop basses. La défécation à l'acétate de plomb et le dégraissage au benzène du résidu sec de l'extrait, obtenu du cristallin, améliorèrent les résultats sans les rendre satisfaisants.

Sommaire

Le dosage direct des sucs antiscorbutiques *frais*, fait à l'aide du réactif BEZSSONOFF, donne, en général, des résultats qui correspondent avec ceux obtenus par épreuve sur cobaye. Toutefois, une erreur en moins est possible dans le cas de végétaux qui contiennent de la vitamine sous forme combinée, exemple: le chou. Une hydrolyse prudente élimine cette erreur.

Le suc, extrait des végétaux *conservés*, par exemple de la choucroute, titré au réactif BEZSSONOFF, peut accuser une teneur en diénol qui ne correspondra nullement à celle en vitamine C active. D'après le tracé de la courbe caractérisant le diénol en question, il est possible d'établir la teneur du suc en vitamine intacte. L'exactitude de ces déterminations fut prouvée par expériences sur cobayes.

L'urine humaine, celle du cobaye et du cheval se montrent capables de provoquer la réaction violette du diénol. Les courbes colorimétriques qui caractérisent le diénol peuvent s'identifier à la courbe de l'acide ascorbique ou prendre un aspect différent. Nous estimons que, dans le premier cas, le diénol excrété est bien l'acide ascorbique et que, dans les autres cas, la réaction diénolique est provoquée par un produit d'évolution de la vitamine C.

Le lait, fourni par une grande entreprise locale, éprouvé sur cobaye au cours de l'été, accusa une teneur moyenne en acide ascorbique de 38 mg. par litre. Mesurée en novembre par notre procédé, cette teneur fut estimée égale à 28 mg. par litre.

Nordmann et Van Wien (1934) ont eu recours à notre procédé pour doser l'acide ascorbique contenu dans le cristallin de différents mammifères. La courbe de titration au dichlorphénol-indophénol, qui caractérisait le diénol présent dans l'extrait du cristallin, accusait une correspondance satisfaisante avec la courbe de l'acide ascorbique. Par contre, de même que dans le cas des urines, l'épreuve électrométrique de cet extrait indiqua les valeurs de potentiel beaucoup plus basses.

Cependant, une expérimentation fort ingénieuse qui vient d'être faite par Reiss et Nordmann (communication privée) montre que quand on opère sur le lapin *vivant*, la mesure électrométrique du potentiel du cristallin donne aussi une valeur qui correspond exactement à la concentration de la vitamine C, déterminée précédemment dans le cristallin à l'aide de la réaction violette.

CHAPITRE QUATRIEME

LES REACTIONS COLOREES DES LIPIDES TRAITES AU REACTIF B

GENERALITES

Certains lipides solubilisés dans l'éther du pétrole ou dans le benzène, et traités par une solution aqueuse du réactif B, provoquent des réactions colorées typiques.

L'épreuve est faite ordinairement en introduisant dans un tube à essai un volume de la solution lipidique, additionné de deux volumes de la solution du réactif B. On prépare ce dernier en dissolvant 0,2 gr. de cristaux de réactif B dans 100 cm^3 d'acide sulfurique à 5 % volumétrique. Après un secouage énergique du tube et la séparation de l'émulsion, on constate, s'il y a lieu, l'apparition d'une teinte dans la couche lipidique ou aqueuse ou dans les deux simultanément. Il est évident que quand le solvant lipidique contient un des corps susceptibles de provoquer une réaction colorée en milieu aqueux acide, on la verra apparaître dans la couche aqueuse. Mais là s'arrête l'analogie entre les réactions colorées que provoque le réactif B introduit dans une solution aqueuse ou émulsionnée avec une solution lipidique. L'exemple qui va suivre le démontrera.

Les solutions lipidiques de certains composés insolubles dans l'eau, tel que le lycopène, le carotène, la vitamine A, traitées au réactif B, provoquent une coloration violette de la couche aqueuse (1). Cependant, aucun de ces corps ne possède une fonction diénolique et deux d'entre eux, le lycopène et le carotène, ne contiennent même pas un atome d'oxygène. Aussi, en comparant leur structure à celle des corps étudiés en milieu aqueux, on ne pourrait prévoir leur faculté de donner la réaction violette. Notons de suite que la réaction violette qui apparaît dans les solutions lipidiques ne peut être confondue avec celle que provoque la vitamine C, cette dernière étant totalement insoluble dans l'éther de pétrole et le benzène.

Les réactions colorées obtenues en ces conditions se révèlent relativement stables. La mesure de leur intensité est parfois rendue difficile par la persistance de l'émulsion. Une telle mesure est d'ailleurs presque toujours moins certaine que celle qu'on effectue en opérant uniquement en solution aqueuse. La réaction colorée se produisant par suite du contact de deux liquides non miscibles entre eux, son intensité se trouve influencée par des facteurs difficilement contrôlables.

Cette circonstance n'exclut pas la possibilité d'obtenir diverses indications utiles, basées sur des réactions colorées de ce type, les réserves concernant principalement la réaction colorée qui se manifeste dans la couche benzènique; quant à la réaction violette de la couche aqueuse qui signale la présence de la vitamine A, dans

---

(1) Les deux pigments pris en excès provoquent une coloration verte fugace, qui apparaît au lieu de contact des deux couches.

la plupart des cas elle se laisse mesurer quantitativement, l'hydroquinol servant d'étalon. Seule la persistance de l'émulsion gêne parfois ces mesures. On élimine cet obstacle en introduisant dans les tubes 0,5 cm^3 d'alcool amylique ou en les laissant au repos un temps suffisamment long, mais ne dépassant pas 30 minutes. A condition d'éviter un excès inutile de réactif, cette réaction se révèle d'une stabilité suffisante.

Les réactions colorées et le spectre d'absorption de la vitamine A

Nous venons d'indiquer que le réactif B provoque la même réaction violette en présence de la vitamine A, du carotène et du lycopène. Quand on utilise une technique adéquate, l'intensité de la réaction mesure exactement la concentration de ces corps dans le liquide soumis à l'épreuve. L'intérêt que présente cette réaction réside en ce qu'elle fournit un moyen de contrôler les indications obtenues à l'aide d'autres procédés.

Pour démontrer l'utilité d'un tel contrôle, nous sommes obligés d'indiquer brièvement en quoi ces procédés consistent. Nous citerons en premier lieu deux réactifs qui provoquent généralement, en présence de la vitamine A, une coloration bleue fugace, celui de CARR et PRICE et celui de DRUMMOND. Le réactif proposé par CARR et PRICE est une solution qu'on obtient en solubilisant 30 gr. de $Sb\ Cl^3$ dans 160 cm^3 de chloroforme, et le réactif de DRUMMOND est le $(CH^3)^2\ S\ O^4$.

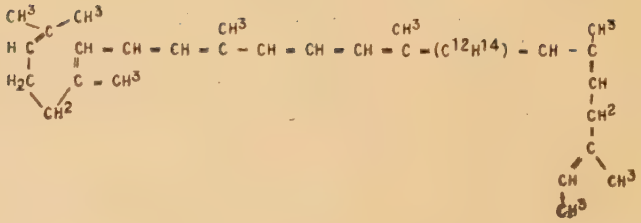
L'épreuve au réactif de CARR et PRICE est faite en introduisant le réactif dans une solution également chloroformique du lipide éprouvé. L'épreuve au réactif de DRUMMOND, le diméthylsulfate, se fait en introduisant ce liquide dans une solution benzènique de la substance éprouvée. Dans les deux cas, la réaction colorée se produit donc au sein d'une solution lipidique, tandis que celle, provoquée par le réactif B apparaît dans une solution aqueuse.

Le réactif CARR et PRICE, mis en présence de carotène, fait également apparaître une coloration bleue, dont la teinte diffère légèrement et qui se révèle plus stable que celle qui caractérise la vitamine A. Ce même réactif ne provoque aucune réaction bleue, introduit dans une solution de lycopène. Par contre, le diméthylsulfate colore en bleu aussi bien les solutions du carotène que celles du lycopène.

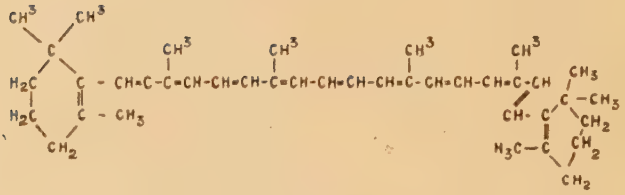
La spectrophotométrie fournit un autre moyen d'identifier la présence et de doser la concentration de la vitamine A. En effet, le spectre d'absorption dans l'ultra-violet de ce composé se distingue par la présence d'une bande très caractéristique dont le sommet correspond à l'onde 328 m μ. Une telle bande n'apparaît ni dans le spectre du lycopène, ni dans celui du carotène.

Comparant la structure du lycopène, du carotène et de la vitamine A, on peut se rendre compte de la nature des groupements atomiques qui provoquent les trois réactions colorées et conditionnent l'apparition de la bande caractéristique de l'absorption dans l'ultra-violet.

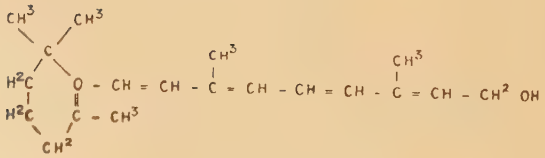
Lycopène.



Carotène β.



Vitamine A β.



Les réactions du diméthylsulfate et du réactif B qui se produisent avec les trois corps sont de toute évidence provoquées par les groupements polyéniques sous forme :

$$-\overset{\overset{CH^3}{|}}{C}=C-C-CH=CH-\overset{\overset{CH^3}{|}}{C}-$$

Ces groupements sont en effet les seuls communs à tous les trois composés. Le Sb Cl^3, qui ne réagit qu'avec le carotène et la vitamine A, accuse par cela même que sa réaction est due au noyau du pseudo-ionone, présent dans ces deux substances et que ne contient pas le lycopène.

Enfin, l'indice spectrophotométrique apparaît aussi comme étant lié, ainsi que l'a déjà noté EULER (1932), avec la présence d'un noyau de pseudo-ionone. Cependant, de tous les trois corps cet indice ne caractérise que la vitamine A. La présence d'un deuxième noyau de pseudo-ionone dans la molécule du carotène, non seulement ne conduit pas à un renforcement de la bande d'absorption 328 m μ, mais, au contraire, mène à la disparition de cette bande remplacée par une autre.

Il ressort de cet exposé que des quatre tests examinés, l'analyse spectrale apparaît comme étant la plus spécifique par rapport à la vitamine A. La réaction au Sb Cl^3 se classe de suite après, puisqu'elle s'adresse à un groupement d'atome aussi caractéristique que le noyau du pseudo-ionone. Un tel classement s'accorde aussi avec les résultats de nombreuses recherches consacrées au contrôle des indications formées par ces deux tests à l'aide d'expériences sur rats, recherches dues

principalement à MORTON (DRUMMOND et MORTON, 1929; HEILBRON, GILLAM et MORTON, 1931; GILLAM et MORTON, 1931; COWARD, DYER, MORTON et GADDUM, 1931).

Quand on a reconnu un test comme étant le plus spécifique, il peut paraître superflu de recourir à d'autres. Cela serait exact si la spécificité de ce test était absolue ou si tous les tests s'adressaient à un même groupe d'atome du corps qu'on cherche à identifier. Or, ceci n'est pas le cas. MORTON lui-même a pu constater l'écart considérable qui se manifeste entre la teneur en vitamine de différentes huiles de poisson, déterminée par dosage biologique et par mesure de l'intensité d'absorption à 328 m μ. Citons quelques-uns de ses chiffres (COWARD, DYER, MORTON et GADDUM, 1931) :

Valeur spectrophotométrique....	70	92	257	103	130
Valeur biologique	78	78	153	155	246

Ces chiffres témoignent d'un désaccord important entre la teneur en vitamine A, déterminée par épreuves sur rats, épreuves nombreuses et bien conduites, et par mesure spectrophotométrique. MORTON reconnaît d'ailleurs que la bande d'absorption, située entre 320-330 m μ ne peut servir comme test spécifique de la vitamine A, elle ne fait que refléter une des propriétés de la vitamine.

Nous exprimons la même idée en disant que le test en question s'adresse à un groupe atomique, compris dans la molécule de la vitamine A. Or, si d'autres tests, en l'espèce les réactions colorées, s'adressent à d'autres groupes atomiques de la vitamine et si, en outre, chacun

d'eux réagit avec un groupe différent, en combinant tous ces tests on doit arriver à identifier avec sûreté la vitamine. Dans ce cas, telle ou autre modification dans la structure de la vitamine, non révélée par un test, le sera par un autre. La spécificité de chacun des tests, pris séparément, devient, en certaines limites, une question secondaire. Nous avons d'ailleurs exposé, au début du chapitre troisième, les considérations qui s'y rapportent, aussi il est inutile d'insister là-dessus à nouveau.

Par contre, il importe de préciser que l'indice spectrophotométrique et les trois réactions colorées s'adressent à des propriétés différentes de la molécule de la vitamine A. Nous avons vu déjà que l'indice spectrophotométrique et la réaction du $Sb\ Cl^3$ se rapportent à des groupements atomiques qui, tout en étant différents, comprennent le noyau du pseudo-ionone. Par contre, les réactions que provoquent le réactif B et le diméthylsulfate s'adressent à des groupements polyéniques. On pourrait en conclure que ces deux dernières réactions font double emploi. Une telle conclusion serait erronée. Le fait que le mécanisme de ces deux réactions est nettement distinct indique déjà qu'elles reflètent des propriétés différentes de la molécule. En effet, les modalités de la réaction du diméthylsulfate sont semblables à celles de la réaction du $Sb\ Cl^3$ et non du réactif B. Dans les deux cas, on constate l'apparition d'une teinte bleue fugace se produisant, et ne pouvant se produire qu'au sein d'une solution lipidique.

D'après MORTON, la coloration bleue que provoque le $Sb\ Cl^3$ est due à la formation d'un composé complexe très instable du type: (chromogène) $Sb\ Cl^3$ et (chromogène)^2 $Sb\ Cl^3$. Il est très probable que la réaction du

diméthylsulfate se passe de même, le réactif se fixant sur les groupements polyéniques et non sur le noyau du pseudo-ionone comme dans le cas du $SbCl^3$.

Le mécanisme de la réaction que provoque le réactif B est tout autre. La coloration violette qui correspond à une réduction du réactif apparaît dans une solution aqueuse, la solution lipidique pouvant rester incolore. L'expérience confirme que les réactions colorées qu'on obtient avec les lipides en présence du diméthylsulfate et du réactif B peuvent être nettement différentes.

Opérant d'après le procédé de TSVET, j'ai isolé d'une solution benzènique qui contenait les lipides de la carotte différentes fractions. Les fractions initiales donnaient les réactions typiques, bleue avec le diméthylsulfate, violette avec le réactif B. Poursuivant le fractionnement, j'ai obtenu des solutions qui se coloraient en brun, traitées par le diméthylsulfate et donnant la réaction violette typique en présence du réactif B. D'autres, par contre, ne provoquaient aucune réaction colorée par addition du réactif B et donnaient une réaction bleue fugace en présence du diméthylsulfate. Une certaine fraction conservait les propriétés de la solution initiale et donnait aussi bien la réaction violette que la réaction bleue. L'épreuve sur le rat de cette dernière fraction donnait invariablement un résultat positif.

Ainsi on devait s'attendre à ce que, quand les deux réactifs s'accordent pour donner une réaction positive ou négative, la certitude de ce témoignage conjugué dépasse de beaucoup celle d'une indication isolée, fournie par l'un des deux réactifs. Comme nous le verrons, elle peut même se révéler supérieure à la certitude du test

$SbCl^3$, et pourtant ce dernier possède une spécificité par rapport à la vitamine A qui dépasse nettement la spécificité du réactif B et du diméthylsulfate, utilisés isolément.

MITTELMANN imagina un procédé de conservation du foie de morue qui conduisait à l'obtention de l'huile de morue en conditions spéciales. Nous avons procédé aux épreuves colorimétriques de cette huile sans posséder encore aucun renseignement sur sa teneur en vitamine A mesurée biologiquement (BEZSSONOFF, 1929).

D'après le procédé MITTELMANN (MITTELMANN, 1925-1927, ARNOLD, 1928), le foie frais de morue est immédiatement mis en boîte de conserve et autoclavé à 120°, l'huile incolore se sépare à l'intérieur de la boîte. Cette huile, de goût agréable, se distingue par l'absence de l'odeur typique, désagréable, propre à toutes les huiles de foie de morue préparées par n'importe quel procédé industriel actuellement en usage. On éprouva une telle huile immédiatement après l'ouverture de la boîte de conserve. Elle donna avec intensité les réactions violette et bleue avec l'acide monomolybdo-phospho-tungstique et le diméthylsulfate, mais la réaction bleue avec le trichlorure d'antimoine ne se produisit pas. Les trois réactions colorées se manifestèrent comme toujours en présence d'un échantillon d'huile commerciale. L'intensité des deux premières fut de deux fois environ moindre que celle obtenue avec l'huile MITTELMANN. Cette dernière, éprouvée à nouveau dix jours après l'ouverture des boîtes, donna cette fois la réaction bleue avec le trichlorure d'antimoine, tandis que l'intensité des deux autres réactions s'affaiblit très légèrement. En même temps commença à se manifester l'odeur désagréable très caracté-

ristique qui distingue toutes les huiles de foie de morue commerciales. Ainsi, le contact de l'air provoque simultanément la propriété des huiles de dégager cette odeur (probablement due à la formation de corps à liaison éthylénique) et celle de donner la réaction bleue avec le trichlorure d'antimoine.

LOVERN, CREED et MORTON (1931), et HEILBRON, GILLAM et MORTON (1931) ont vérifié mes données, recourant à des expériences nombreuses et détaillées. Ils ne s'accordèrent pas avec moi concernant le goût agréable que possède l'huile, obtenue d'après le procédé MITTELMANN. Par contre, ils purent se convaincre que cette huile donne une réaction anormalement faible avec le $Sb\ Cl^3$ et que sa faculté de provoquer cette réaction augmente au contact prolongé de l'air ou par suite d'un traitement à l'ozone. Ils certifient également qu'en contradiction avec le test $Sb\ Cl^3$, l'huile éprouvée sur le rat se révèle posséder une teneur normale en vitamine A.

Par conséquent, les données de ces auteurs confirmèrent pleinement l'indication que j'avais obtenue par épreuve conjuguée au réactif B et au diméthylsulfate. Au cours des expériences qui viennent d'être mentionnées, on constata que quand les épreuves au réactif B et au diméthylsulfate indiquent simultanément la présence de la vitamine A et l'épreuve au $Sb\ Cl^3$ se montre négative, c'est l'indication fournie par le test conjugué qui s'avère exacte.

Citons maintenant une observation qui permet de se convaincre que quand les épreuves au réactif B et au diméthylsulfate donnent un résultat négatif, celle au $Sb\ Cl^3$ étant positive, c'est de nouveau l'épreuve conjuguée qui fournit le résultat valable.

Un extrait dans l'éther de pétrole d'une préparation isolée de jus de carotte fut conservé en très large contact avec l'air dans l'obscurité pendant 20 jours. La couleur de l'extrait vira complètement de l'orangé au vert. Le verdissement accompagne toujours l'oxydation des extraits conservés dans ces conditions. Cet extrait ne donna plus les réactions bleue et bleue-violette avec le réactif de DRUMMOND et avec l'acide monomolybdophospho-tungstique, mais continua à donner avec intensité la réaction de CARR et PRICE.

L'extrait en question, débarrassé de l'éther de pétrole et dissous dans l'huile d'arachide, fut éprouvé sur rat, soumis à un régime privé de vitamine A, en doses de 20 mg. L'épreuve permit de constater que l'extrait était privé de vitamine A.

Si l'épreuve conjuguée aux réactifs DRUMMOND et B peut, dans certains cas, être plus certaine que l'épreuve au Sb Cl^3, on ne saurait en déduire que c'est là une règle générale. L'exemple du lycopène qui, étant privé d'action biologique A, donne les deux premières réactions, mais ne réagit pas avec le Sb Cl^3, ainsi que d'autres données, prouve que le contraire est de beaucoup plus vraisemblable.

Aussi les exemples que nous avons cités ne servent qu'à démontrer l'utilité du principe même de la conjugaison des épreuves. Mais il est évident que pour identifier et doser la vitamine A avec le maximum de sûreté, on devrait utiliser simultanément les quatre teste précités.

Notons que, de même que le test spectrophotométrique, la réaction B se prête bien à une estimation quantitative. Les réactions au Sb Cl^3 et $(CH^3)^2$ SO^4 étant

fugaces, leur intensité ne peut être estimée que très approximativement. De même que dans le cas de la vitamine C, on doit éviter d'introduire en grand excès le réactif B quand on l'emploie pour le dosage de la vitamine A. On utilise une solution contenant 0,2 % de réactif. L'intensité de la coloration violette, qui s'obtient en faisant réagir 4 cm^3 de cette solution avec 2 cm^3 de la solution benzènique, ne doit pas dépasser la valeur de 4 U. H. Quand le réactif B est employé en vue du dépistage de la vitamine D, on l'utilise en plus forte proportion. Aussi l'épreuve de la vitamine A doit être faite séparément.

L'INTENSITE DE LA REACTION VIOLETTE D'UNE MOLECULE D'HYDROQUINOL, DE CAROTENE ET DE VITAMINE A

Le rapport entre les intensités de la réaction violette que provoque une molécule d'hydroquinol, de carotène et de vitamine A fut précisé à l'aide d'épreuves faites en collaboration avec M^me^ WOLOSZYN, ingénieur chimiste.

Au cours de ces épreuves, on s'est servi, comme base de comparaison, de l'unité (U. H.), autrement dit de l'intensité de coloration violette que provoque une solution 10^{-5} N exacte d'hydroquinol, par conséquent d'une coloration donnée par 1,1/1000 et non pas 1/1000 mg. d'hydroquinol dans 1 cm^3 d'eau. Nous avons utilisé une préparation de carotène β, isolée de la carotte d'après les principes de la méthode de M^lle^ VAN STOLK, GUILBERT, PENAU et SIMONNET (1931). Le point de fusion des cristaux en tube capillaire était de 176°-177° C. La te-

neur effective en carotène des solutions benzèniques soumises à l'épreuve au réactif B fut vérifiée par nous par comparaison colorimétrique avec des solutions de bichromate de potasse (1).

Rappelons que, d'après les données de CONNOR que j'ai pu confirmer (BEZSSONOFF, 1929), la teinte d'une solution aqueuse de bichromite de potasse à 19 gr. par litre égale celle d'une solution benzènique contenant 48 mg. de carotène par litre.

EPREUVE DE CAROTENE

2 cm^3 d'une solution benzènique contenant par litre 3,35 mg. de carotène, traités par 4 cm^3 de solution aqueuse du réactif B, provoquent dans la solution aqueuse l'apparition d'une teinte violette égale à 2,97 ou 3 (U. H.). Le volume de la solution aqueuse étant deux fois celui de la solution benzènique, le nombre de (U. H.) trouvé doit être multiplié par deux, ce qui donne 6 (U. H.). Le poids moléculaire du carotène est de 536, la concentration de sa solution benzènique était donc de $0{,}62.10^{-5}$ N. Cette solution provoquait la même coloration violette que la solution d'hydroquinol de 6.10^{-5}. Ainsi 1/10 de molécule de carotène réagissait de même qu'une molécule d'hydroquinol, autrement dit une molécule de carotène provoque une réaction violette environ dix fois plus intense qu'une molécule d'hydroquinol.

---

(1) Le Congrès International de Londres (1931) pour l'étalonnage des vitamines (Mme RANDOIN, 1931 et 1933), ayant proposé comme unité de mesure de l'action de la vitamine A 1/1000 de milligramme de carotène, a omis de prescrire un test colorimétrique du carotène. Or, le carotène soigneusement recristallisé et conservé en tube scellé dans le vide ou dans l'azote peut subir une transformation allant jusqu'à 30 % du poids total de l'échantillon.

EPREUVE DE LA VITAMINE A

Ne disposant pas d'un échantillon de vitamine A pure, nous avons opéré avec une préparation concentrée, isolée de l'huile de foie d'un poisson (le Hallibut), solubilisée dans l'huile d'olive. 1 cm^3 de cette solution contenait, d'après l'épreuve sur animaux, 4.000 unités internationales de vitamine A.

Récemment, MOOR (1933) a prouvé à l'aide d'expériences aussi rigoureuses que démonstratives que, administrés à poids égal, le carotène et la vitamine A exercent sur le rat une action sensiblement équivalente. L'organisme du rat transformerait donc quantitativement le carotène en vitamine A. L'unité internationale étant 1/1000 de mg. de carotène, 4.000 unités équivalent à 4 mg. de carotène ou, d'après MOOR, à 4 mg. de vitamine A pure. Cette quantité de vitamine A devait donc être contenue dans 1 cm^3 de la préparation objet de notre épreuve.

Procédant à l'épreuve, nous avons dilué 0,25 cm^3 de la préparation, contenant 1.000 unités A ou 1 mg. de vitamine A, dans 500 cm^3 de benzène. 2 cm^3 de cette solution, traités par 4 cm^3 de la solution aqueuse du réactif B, ont provoqué une coloration violette de la couche aqueuse égale à 1,8 (U. H.). Le volume de la solution aqueuse étant deux fois celui de la solution benzènique, le chiffre de 1,8 (U. H.) doit être multiplié par deux: 1,8 (U. H) $\times$ 2 = 3,6 (U. H.). Ainsi, 2 mg. de vitamine A, dissous dans un litre de benzène, provoquent une réaction violette de 3,6 (U. H.). Le poids moléculaire de la vitamine A étant de 286, une teneur en vitamine A

de 2 mg. par litre correspond à la concentration moléculaire en vitamine A de $0{,}7.10^{-5}$ N. Par conséquent, l'intensité de la réaction violette que provoque une solution d'hydroquinol de $3{,}6 : 10^{-5}$ N égale celle que donne une solution de vitamine A $0{,}7 : 10^{-5}$ N. On en conclut qu'une molécule de vitamine A provoque une réaction violette environ cinq fois plus intense qu'une molécule d'hydroquinol.

Ces résultats concordent avec ceux qu'on obtient en opérant avec des huiles de foie de morue prises telles quelles. Citons en premier lieu l'épreuve faite en 1934 de l'huile de foie de morue fournie par la pharmacie des Hospices Civils de Strasbourg. La provenance et la fraîcheur de cette huile ayant été contrôlées, on pouvait s'attendre à ce que sa teneur en vitamine A soit proche de celle de l'huile de foie de morue « standard », donc égale à 100.000 unités internationales ou de 100 mg. de vitamine A par litre, estimation basée sur les données de Moor (1933). 1 cm^3 de cette huile fut dilué dans 50 cm^3 de benzène. 2 cm^3 de la solution benzènique traitée par 4 cm^3 de la solution du réactif B, contenant 0,2 gr. de réactif dans 100 cm^3 d'acide sulfurique à 5 % (volumétrique), provoquèrent une coloration violette de la couche aqueuse de 2,0 (U. H.). L'intensité de la réaction violette, calculée pour un volume égal à celui de la solution benzènique, est donc de 4,0 (U. H.). La solution benzènique devait contenir $100/50 = 2$ mg. en vitamine A par litre. Cette concentration devrait déterminer, d'après l'épreuve citée précédemment, une réaction violette de 3,6 (U. H.) ; on a obtenu en réalité le chiffre très voisin de 4 (U. H.).

L'huile « standard » représentant la valeur *moyenne*

d'une bonne huile de foie de morue, celle fournie par les Hospices pouvait bien contenir en vitamine A 11 % de plus que l'huile « standard ». Toutefois, le dosage colorimétrique n'était pas dans ce cas contrôlé par des épreuves sur animaux. Cependant, en 1930, nous avons eu l'occasion d'expérimenter avec une huile de foie de morue qui nous fut directement expédiée des pêcheries de Norvège. Eprouvée au réactif B, elle montra une valeur très voisine de celle de l'huile des Hospices. Calculée pour des solutions égales, l'intensité de la réaction violette était de 3,9 (U. H.) pour l'huile norvégienne et de 4 (U. H.) pour l'huile des Hospices. Cette même huile norvégienne fut éprouvée sur rat parallèlement avec le carotène (BEZSSONOFF, 1930). L'action d'une dose journalière de 18 mg. d'huile se révéla voisine, mais légèrement supérieure, à celle d'une dose de 2,1/1.000 mg. de carotène. La correction de cette mesure se trouvait confirmée par des épreuves parallèles faites en utilisant des doses de 9 mg. d'huile et de 4,2/1.000 mg. de carotène.

Ainsi le rapport entre les intensités des réactions violettes provoquées par les molécules de vitamine A et d'hydroquinol peut être considéré comme bien établi. Comparée à la réaction violette d'une molécule d'hydroquinol, celle d'une molécule de vitamine A est de cinq fois et celle du carotène dix fois plus forte.

La réaction violette s'adresse au groupement polyénique CH = CH . C^{CH3} = CH . CH =, présent dans les molécules du carotène et de la vitamine A. Ces groupements forment une chaîne deux fois plus longue dans le cas du carotène que dans celui de la vitamine. Ceci explique que la réaction violette d'une molécule de caro-

tène est deux fois plus intense que celle d'une molécule de vitamine A. Le poids moléculaire du carotène étant environ le double de celui de la vitamine A, les deux substances éprouvées à poids égal provoquent une réaction violette dont l'intensité est sensiblement la même.

SUR LA PRECISION ET LA SPECIFICITE DES EPREUVES AUX REACTIFS CARR ET PRICE ET B

La réaction bleue que provoque le $Sb\ Cl^3$ avec la vitamine A *pure*, comparée à poids égal, s'avère vingt fois plus forte que celle du carotène (MOOR, 1933, DANN, 1933). Cette réaction étant due au noyau du pseudo-ionone, on comprend que le rapport entre les intensités avec lesquelles elle se manifeste en présence du carotène et de la vitamine A soit inverse de celui qu'on observe en opérant avec le réactif B. En effet, dans le cas de carotène, la soudure de la longue chaîne des polyènes doit gêner la formation du complexe $(Sb\ Cl^3)^n$ + noyau du pseudo-ionone.

Il importe d'attirer l'attention sur une autre différence très essentielle qui existe entre les deux tests colorimétriques de la vitamine A, l'épreuve au réactif B et celle au $Sb\ Cl^3$. Nous venons de dire que la réaction bleue de CARR et PRICE de la vitamine A *pure* est de vingt fois plus intense que celle du carotène. Cependant, d'après MORTON, MOOR et de nombreux autres auteurs, l'intensité de cette réaction colorée de la vitamine A faiblit considérablement quand la vitamine est éprouvée en mélange avec d'autres lipides. Quand il s'agit de préparations très concentrées obtenues en purifiant la frac-

tion insaponifiable des huiles, la valeur colorimétrique varie du simple au double. La baisse de cette valeur s'accuse particulièrement et ses variations deviennent très prononcées quand on soumet au dosage de CARR et PRICE des huiles de foie de poissons prises telles quelles. Or, ainsi qu'on a pu le voir, l'épreuve au réactif B donne la même valeur colorimétrique pour l'unité de la vitamine A, présente soit dans une préparation concentrée, soit dans l'huile de foie de morue naturelle. Ceci, et la stabilité relative de la réaction violette qui se laisse mesurer en l'espèce d'une demi-heure, confère à cette dernière, comparativement à la réaction de CARR et PRICE, un avantage considérable. Toutefois, cet avantage ne concerne que la précision de la mesure colorimétrique.

Nous avons indiqué plus haut que la spécificité de la réaction de CARR et PRICE, sans être absolue, doit dépasser celle de la réaction violette. Citons à ce propos une observation faite par ORLOW (1930). Cet auteur constata qu'un échantillon spécial d'huile extraite des graines de tournesol (Helianthus) provoquait une réaction violette dont l'intensité dépassait de deux fois celle donnée par les meilleures huiles de foie de morue. Cette même huile éprouvée au $Sb\ Cl_3$ ne provoqua pas de coloration bleue. Notons que d'autres échantillons d'huile de tournesol éprouvés par ORLOW ne donnèrent qu'une faible réaction violette et que la teneur en vitamine A de l'échantillon qui provoquait une réaction B aussi forte ne fut pas contrôlée par épreuve sur animaux. Néanmoins, nous devons convenir qu'il était difficile de s'attendre à ce que l'huile de tournesol puisse être aussi riche en vitamine A.

ORLOW constata également qu'une certaine huile de lin traitée au réactif B donnait une coloration violette

d'intensité égale à celle que provoquèrent les huiles de foie de morue. L'épreuve de cette huile au $Sb\ Cl_3$ fournit un résultat négatif. D'après les données d'expériences sur animaux, on sait que la teneur en vitamine A de l'huile de lin est négligeable. Les deux cas précités confirment que la valeur spécifique de la réaction violette comme test de la vitamine A est limitée. Notons toutefois que, dans la plupart des cas, les huiles végétales et les graisses d'origine animale ne donnent aucune coloration violette quand elles sont privées de vitamine A.

LES REACTIONS COLOREES QUI CARACTERISENT LA DESTRUCTION DE LA VITAMINE D

Quand on traite au réactif B les solutions benzèniques de l'ergostérol irradié et de différents autres lipides contenant la vitamine D, on ne voit apparaître aucune coloration de la couche benzènique. Cependant, cette couche prend une teinte vive et caractéristique quand ces mêmes lipides sont, avant l'épreuve, soit chauffés plusieurs heures à la température de 107° C., soit conservés à la température ordinaire pendant un temps suffisamment long et au contact de l'air. Le phénomène ne se produit pas quand on opère avec une solution d'ergostérol non irradié convenablement dilué avec des solutions de lipides ne contenant pas de vitamine D.

N'ayant pas expérimenté avec un échantillon de vitamine D isolé à l'état pur, nous ne pouvons affirmer que la réaction colorée est due aux produits de destruction de la vitamine elle-même. Il nous paraît même plus probable que la vitamine en se détruisant agit sur les sub-

stances qui l'accompagnent, favorisant la formation du chromogène. Aussi ce n'est que pas abréviation nécessaire que nous désignons dans notre texte ce chromogène en tant que produit de la destruction de la vitamine D.

Quelles que soient les causes exactes de cette réaction colorée, les données que nous exposerons montrent qu'elles se relient étroitement à la présence de la vitamine D dans les produits naturels.

Le fait que la vitamine D contenue dans l'huile de foie des poissons se révèle actuellement posséder une valeur biologique autre que celle de ses isomères, obtenus par irradiation de l'ergostérol, nous paraît conférer un certain intérêt à ce moyen de dépistage de la vitamine D.

LA MESURE DE L'INTENSITE DES COLORATIONS QUI APPARAISSENT DANS LA COUCHE BENZENIQUE

L'appréciation exacte de l'intensité de la coloration qui apparaît dans la couche benzènique se heurte aux difficultés suivantes:

1° La nuance de la coloration se modifie avec la durée du chauffage préalable auquel a été soumis le lipide éprouvé.

2° Elle diffère suivant la nature de ce lipide.

Ainsi le beurre, chauffé à 107-110° durant une heure et demie à quatre heures, donne une réaction rose de la couche benzènique; quand il est chauffé pendant vingt heures, cette réaction est jaune. L'huile de foie de morue fraîche, chauffée d'une à sept heures, donne aussi une réaction rose-grenat qui passe au cours d'un chauf-

fage prolongé en orangé. L'oxydation lente par l'air, à la température de laboratoire, des couches minces d'huile de foie de morue conduit aux mêmes altérations de la nuance.

Les réactions qui ont des nuances rose, grenat et orangé se laissent mesurer par comparaison avec des solutions aqueuses et alcooliques de SOUDAN-BRAUN (marque R. A. L.) et de BISMARK-BRAUN. Les solutions sont préparées de la manière suivante: 0,1 gr. de SOUDAN-BRAUN est dissous dans 100 cm^3 d'alcool éthylique à 95 %. On laisse infuser la solution pendant douze à quatorze heures à la température ordinaire (20° C. environ) en l'agitant fréquemment. La solution est filtrée et sa concentration déterminée par dessication d'une partie aliquote du filtrat. La solution que nous avons utilisée contenait 730 mg. de SOUDAN-BRAUN par litre. Pour la mesure de l'intensité des réactions de nuance rose et grenat, nous nous sommes servis de solutions aqueuses obtenues en diluant la solution alcoolique mère. Pour obtenir une solution aqueuse transparente, 1 cm^3 de la solution alcoolique mère est introduit dans 80 cm^3 d'eau chaude, presque bouillante, bien mélangé et, après refroidissement, transvasé dans un matras gradué et ramené avec de l'eau à 100 cm^3. Cette solution ne se conserve absolument transparente que pendant quelques heures.

Pour la mesure de la coloration jaune-brun qui apparaît dans la couche benzènique, quand les lipides ont été soumis au préalable à un chauffage de trente minutes et plus, on utilise comme étalon une solution de tanin additionnée de réactif B.

EPREUVE AU REACTIF B DE L'HUILE DE FOIE DE MORUE

L'influence d'un chauffage préalable de l'huile sur les réactions qu'elle provoque

L'huile de morue, obtenue du foie frais de morues et reçue directement des pêcheries d'Olesund après deux ans de conservation au laboratoire dans un flacon bouché a été soumise aux expériences suivantes :

5 cm^3 d'huile mise en tubes ont été chauffés au bain de sable à 115° C. pendant 30 minutes, 1 heure, 1 h. 45, 2 heures, 2 h. 45 et 4 heures. On a fait passer l'air avec la vitesse d'une bulle d'air par minute environ. Après refroidissement, on a dilué l'huile dans du benzène, 1 volume d'huile dans 2 volumes de benzène. Les solutions de l'huile chauffée ont été éprouvées au réactif B simultanément avec un échantillon non chauffé.

La couche benzènique des solutions d'huile, chauffées deux heures et plus donnait une réaction rose-orange qui augmentait en intensité quand le temps de chauffage était plus long. Par contre, la réaction violette de la couche aqueuse était la plus intense dans l'huile non chauffée et s'affaiblissait progrissevement. Elle n'était point perceptible dans l'huile chauffée pendant deux heures, mais redevenait visible dans les échantillons chauffés plus de deux heures, tout en affectant un caractère nettement différent.

L'examen de ces premières données nous incita à penser que la réaction violette de la couche aqueuse devait signaler la présence dans l'huile de la vitamine A et que la réaction jaune-orange de la couche benzènique

était provoquée par des produits de destruction de la vitamine D. Cette supposition se basait sur les constatations suivantes:

L'huile de foie de morue fraîche provoquait la réaction violette, ainsi d'ailleurs que différents autres lipides connus pour contenir de la vitamine A. Cette réaction baissait sous l'influence d'un chauffage énergique de l'huile, traitement qui conduit également à la destruction de la vitamine A. Par contre, l'huile fraîche ne donnait aucune réaction jaune. Celle-ci apparaissait et s'intensifiait graduellement sous l'influence du chauffage. Or, la vitamine D, bien que beaucoup plus résistante à l'effet d'un tel chauffage que la vitamine A, est aussi graduellement détruite par son action.

D'autres données vinrent par la suite confirmer notre supposition. Citons en premier lieu celles qui se rapportent à des épreuves comparatives de deux échantillons d'huile de morue de la même provenance, mais dont l'un venait d'arriver de Norvège, tandis que l'autre a séjourné pendant deux ans au laboratoire.

Ni d'après la couleur, ni d'après l'odeur, ces deux échantillons ne se distinguaient l'un de l'autre. Mais l'huile fraîche différait de celle datant de deux ans en ce qu'elle ne donnait point la réaction rose-orange dans la couche supérieure benzènique tant qu'elle n'était pas soumise à un chauffage préalable. Par contre, la réaction violette de la couche aqueuse se manifestait dans cette huile avec beaucoup plus d'intensité. La réaction rose-orange de l'huile fraîche et non chauffée commençait à apparaître seulement quelques heures après l'addition du réactif : 36 heures à la température de laboratoire, 48 heures environ à la température de 10° C.

L'huile fraîche et l'ancienne furent introduites en tubes et chauffées au bain d'huile pendant 4 à 18 heures à la température de 115° C. En plus, d'autres échantillons d'huile fraîche ont été chauffés pendant 6 à 7 heures. On n'a pas laissé passer l'air ni au cours de ces chauffages, ni au cours des chauffages qui suivirent.

Les épreuves au réactif ont été faites avec les échantillons d'huile chauffée et non chauffée, simultanément. Une demi-heure après le traitement au réactif, on constata l'apparition des réactions suivantes:

1° L'huile fraîche, non chauffée, donne une coloration violette intense dans la couche aqueuse et aucune réaction dans la couche supérieure (benzènique).

2° L'huile datant de deux ans, non chauffée, donne une coloration brun-orange dans la couche supérieure et un coagulum au fond du tube, faiblement teinté en gris-violet.

3° L'huile fraîche, chauffée pendant 4 heures, laissa paraître une coloration jaune pâle de la couche supérieure, un coagulum plus abondant que dans l'huile non chauffée, et une coloration violette de la couche aqueuse. En prolongeant le temps du chauffage jusqu'à 5, 6 et 7 heures, on voyait augmenter l'intensité de la coloration jaune et diminuer celle de la coloration violette. Cette dernière, d'ailleurs, n'apparaissait dans ces cas que quarante minutes après l'addition du réactif.

4° L'huile datant de deux ans, chauffée pendant 4 heures, donne une réaction jaune-orange plus intense que l'huile fraîche chauffée pendant 6 et 7 heures.

Augmentant la durée du chauffage jusqu'à 18 heures, on constata que l'intensité de la coloration orange de la

couche benzènique des huiles fraîche et conservée était sensiblement la même, mais que la nuance de la coloration différait nettement. La réaction de l'huile conservée est franchement jaune-orangé et celle de l'huile fraîche tire sur le rose.

Exprimant par 100 unités l'intensité de la teinte orange que donne l'huile fraîche chauffée pendant 18 heures, on obtient le tableau suivant:

Huile fraîche chauffée pendant 18 heures ..	100
Huile fraîche chauffée pendant 7 heures ..	25
Huile fraîche chauffée pendant 5 heures ..	14,6
Huile fraîche chauffée pendant 4 heures ..	13,3
Huile de deux ans non chauffée	52,6

Deux échantillons d'huile de morue fraîche chauffée pendant 18 et 25 heures ont donné le rapport suivant de l'intensité de la réaction orangé, rapport qui a été mesuré deux heures et demie après l'addition du réactif:

18 heures	100
25 heures	150

Signalons que la nuance orangé, comparée d'après la couleur à celle d'une solution en alcool éthylique de BISMARK-BRAUN et de SOUDAN-BRAUN (de marque française R. A. L.), s'obtient aussi à la suite de mélange de quantités infimes de la teinte violette.

Les résultats des épreuves que nous venons de décrire peuvent être résumés comme suit:

1° Huile de morue fraîche, non chauffée:

a) absence de la réaction orange dans la couche supérieure benzènique;

b) réaction violette, immédiatement, nette dans la couche inférieure aqueuse.

2° Huile de morue de deux ans, conservée dans un flacon bouché, non chauffée: apparition immédiate d'une réaction orange très nette; apparition d'une réaction violette dans la couche inférieure aqueuse, mais moins forte que celle de l'huile de morue fraîche.

3°-4° Huile de morue fraîche et celle de deux ans chauffées pendant plusieurs heures:

a) Le prolongement du temps de chauffage influe sur la réaction orange qui s'intensifie progressivement;

b) Par contre, la réaction violette s'affaiblit au fur et à mesure que le chauffage se prolonge. Cet affaiblissement se perçoit surtout dans le cas de l'huile de deux ans, chauffée pendant deux heures, et celui de l'huile fraîche, chauffée pendant quatre heures. Les échantillons d'huile, chauffés plus longtemps, donnent de nouveau la réaction bleue, mais elle est faible, apparaît tardivement et présente un aspect très différent. Au fur et à mesure que le chauffage se prolonge, la réaction rose-orange de la couche benzènique change en réaction orange;

c) La réaction orange de l'huile de deux ans non chauffée est plus forte que celle de l'huile fraîche chauffée moins de 7 heures. Quand les deux huiles sont chauffées pendant 18 heures, l'intensité de leur réaction orange s'égalise;

d) Les échantillons de l'huile de morue fraîche et de l'huile conservée pendant deux ans au laboratoire, chauffés pendant 18 heures, ont donné une réaction orange à peu près de la même intensité, tandis que l'huile fraî-

che, non chauffée, ne donnait point cette réaction et l'huile de deux ans, non chauffée, donnait une réaction dont l'intensité égalait 52 % de celle des huiles chauffées pendant 18 heures.

L'influence du chauffage sur les réactions colorées de l'huile de foie de morue est due à une oxydation

Ainsi qu'on va le voir, plus on augmente la surface de l'huile chauffée, facilitant le contact avec l'air, plus rapide devient l'action du chauffage.

Des quelques données déjà mentionnées, on a pu voir qu'un certain degré d'oxydation renforce la réaction jaune et affaiblit la réaction violette de l'huile de foie de morue. Ainsi l'huile de foie de morue fraîche, chauffée pendant 30, 40 et 45 heures dans des tubes bouchés au coton de verre, a donné une réaction plus faible que cette même huile chauffée pendant la même durée de temps dans des bechers de $33^{m}/^{m}$ de diamètre. Deux échantillons d'huile — dont l'un a été conservé pendant deux ans au laboratoire et l'autre récemment reçu des pêcheries — ont donné sans chauffage les réactions suivantes:

L'huile fraîche, une forte réaction violette de la couche aqueuse, pas de réaction colorée dans la couche benzènique;

L'huile de deux ans, une réaction orange franche et une réaction violette sensiblement plus faible.

L'huile de foie de morue (5 cm^3) chauffée à 115° C. pendant 5 heures dans des flacons d'Erlenmeyer de 100 cm^3, a donné une réaction 7 fois plus forte que cette même quantité d'huile chauffée dans des tubes, les au

tres conditions étant pareilles. La teinte de la réaction est jaune dans le flacon et rose dans le tube. L'huile chauffée pendant 18 heures dans un tube donnait une réaction une fois et demie plus faible que la même huile chauffée pendant 5 heures dans un flacon.

Le même phénomène, affaiblissement de la réaction violette et renforcement de la réaction jaune, peut être observé sans avoir recours à l'action d'une température élevée, mais en augmentant la surface et le temps de contact de l'huile de morue avec l'air.

On a pris deux échantillons d'huile de foie de morue de la même origine. Le premier échantillon a été conservé au laboratoire dans une bouteille pendant un mois, le deuxième pendant deux mois; les deux bouteilles avaient été remplies à moitié.

Quatorze et vingt-huit jours avant l'épreuve, 5 et 20 cm^3 d'huile des deux échantillons ont été mis dans des boîtes de Petri de 9 cm. de diamètre.

Réaction de la couche benzènique

Les différents échantillons sont dilués au tiers dans du benzène. On verse dans des tubes 3 cm^3 du mélange benzène-huile et on ajoute 12 gouttes de réactif à 15 %. On fait la lecture après trois heures et demie.

1° L'huile conservée en bouteille pendant un mois donne une faible teinte rose = 13,5 mg. de SOUDAN par litre d'eau;

2° L'huile conservée en bouteille pendant deux mois donne une teinte rose plus intense = 18,2 mg. de SOUDAN par litre d'eau;

3° L'huile conservée en bouteille pendant un mois, abandonnée ensuite pendant 14 jours dans une boîte de Petri, donne une coloration jaune-orange.

Cette coloration se renforce quand on prolonge l'exposition de l'huile dans la boîte de Petri jusqu'à 28 jours. Le même phénomène fut constaté opérant avec l'huile conservée en bouteille deux mois. Dans ce cas, l'augmentation de l'intensité de la réaction donnée par l'huile conservée 28 jours en boîte de Petri fut particulièrement nette. L'intensité de la coloration provoquée par l'huile ayant séjourné 14 jours en boîte de Petri étant = 1, celle correspondant à 28 jours était = 1,4.

A.-N. VOSKRESSENSKY, opérant en conditions analogues avec un échantillon d'huile de foie de morue du commerce, put constater une augmentation de la coloration de la couche benzènique qui s'exprimait encore plus nettement.

Données de A.-N. VOSKRESSENSKY (1) :

Intensité de la réaction jaune mesurée :	immédiatement	20 heures après l'addition du réactif
Huile conservée dans une bouteille ..	0,01	0,025
Huile étalée en couche mince au fond d'un matras ouvert, laissée pendant 7 jours	0,5	1,4

Comme on peut le voir, une faible oxydation par l'air à la température de 15 à 25° C. affaiblit la réaction violette de la couche aqueuse et renforce la réaction de la couche benzènique.

L'intensité de la réaction de la couche banzènique est donc un bon indice pour déceler des petites altérations

(1) Communications privées.

survenues au cours de la conservation de l'huile de foie de morue.

Il nous reste à examiner l'influence de l'oxydation par un agent chimique, le permanganate de potasse. 10 cm^3 d'huile de foie de morue fraîche et 20 cm^3 d'acide sulfurique à 20 % volumétrique ont été mélangés et secoués à la température de laboratoire avec 40, 20 et 10 cm^3 d'une solution de permanganate de potasse à 5 %. Le permanganate a été ajouté progressivement par 5 cm^3 et le mélange secoué jusqu'à sa décoloration presque complète. Dans le premier cas, on n'a pas réussi à obtenir une décoloration complète, même après 24 heures de contact avec le permanganate — il persistait une légère teinte jaune-brun. Ensuite, les différents échantillons d'huile ont été lavés à plusieurs reprises par agitation avec de l'eau distillée. On s'est débarrassé de l'émulsion par des filtrations répétées sur un filtre en papier sec, et en ajoutant du benzène à de l'huile traitée par du permanganate et lavée ensuite. On déterminait exactement le volume de l'huile qui se dégage de l'émulsion et se solubilise dans le benzène.

Les produits siuvants ont été éprouvés au réactif:

1° l'huile de foie de morue fraîche, non traitée par du permanganate de potasse;

2° l'huile traitée par du permanganate à 5 %, volume sur volume;

3° l'huile traitée par du permanganate de potasse, deux fois son volume;

4° l'huile traitée par du permanganate, quatre fois son volume.

Les huiles ont été diluées au tiers dans du benzène. Chaque tube a reçu 2 cm^3 de cette solution et 12 gouttes de réactif à 15 %. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

	immédiatement après addition du réactif		2 heures après		20 heures après	
	couche inférieure aqueuse	couche supérieure benzènique	couche inférieure aqueuse	couche supérieure benzènique	couche inférieure aqueuse	couche supérieure benzènique
Huile de morue fraîche non traitée	forte réaction violette	incolore	coloration violette dense	faible coloration rose	coloration noire-violette	coloration pourpre nette
1 volume d'huile de morue fraîche + 1 vol. de perm à 5 %	faible teinte grise du coagulum	—	teinte grise	incolore	coloration grise nette du coagulum	coloration orange faible, mais nette
1 volume d'huile fraîche + 2 volumes de permang. à 5 %	incolore	—	faible teinte grise	—	coloration grise	coloration orange à peine perceptible
1 volume d'huile fraîche + 4 volumes de permang 5 %	—	—	—	—	coloration grise	incolore

Observée 20 heures après l'épreuve au réactif, la coloration de la couche benzènique de l'huile non traitée était 3,5 à 4 fois plus forte que celle de l'huile traitée par la plus faible dose de permanganate.

Ensuite, nous avons fait l'expérience suivante : l'huile de foie de morue fraîche fut traitée, comme indiqué, par le permanganate de potasse à 5 % ; 4 volumes de permanganate sur 1 volume d'huile.

Des échantillons de cette huile ont été chauffés dans des tubes pendant 4 heures à 107° C., simultanément avec des échantillons de cette même huile non traitée par le permanganate.

Les résultats obtenus au cours de ces épreuves sont résumés dans le tableau ci contre :

	10 minutes après la réaction		20 minutes après	1 à 40 minutes après	40 heures après
	couche inférieure aqueuse	couche supérieure benzènique	couche supérieure benzènique	couche supérieure benzènique	couche supérieure benzènique
Huile de morue fraîche non chauffée et non traitée par du permanganate	forte réaction violette	incolore	incolore	—	coloration rose
Huile non chauffée traitée par du permanganate	incolore	—	incolore	coloration jaune très faible	coloration jaune faible mais nette
Huile chauffée pendant 4 heures non traitées par du permanganate	coloration bleu-violet	coloration orange	coloration rose-orange	coloration rose-orange	coloration orange pourpre
Huile chauffée pendant 4 heures traitée préalablement par du permanganate	coloration gris-bleu	coloration orange	coloration orange un peu plus faible que de l'huile non traitée	coloration jaune-brun	coloration jaune-brun

Quarante heures après l'épreuve, la réaction de la couche graisseuse de l'huile, chauffée pendant 4 heures et non traitée par le permanganate, était 1,5 fois plus forte que celle de l'huile non chauffée, tandis que l'huile traitée par le permanganate, chauffée pendant 4 heures, donnait une réaction 1,7 fois plus forte que l'huile traitée par le permanganate, mais non chauffée. La différence de teinte ne permettait pas la comparaison exacte de l'intensité des réactions des huiles traitées et non traitées par le permanganate. L'intensité des réactions des deux huiles chauffées pendant 4 heures était à peu près pareille.

Ainsi l'oxydation de l'huile de foie de morue par le permanganate à froid a confirmé les résultats obtenus au cours de l'oxydation par l'oxygène de l'air, soit avec chauffage, soit à la température ordinaire. Dans tous ces cas, l'oxydation se traduisait par la diminution de la coloration violette, tandis que la réaction jaune était renforcée sous l'influence de l'oxydation par l'air. Seulement dans le cas où l'on combinait les deux traitements oxydation par le permanganate et chauffage, on constatait une légère diminution de l'intensité de la réaction jaune, comparée à celle que provoque le chauffage de l'huile non oxydée par le permanganate. Le chauffage de l'huile traitée par le permanganate de potasse amenait vraisemblablement à la formation d'à peu près la même quantité de chromogène qui se formait au cours du même chauffage de l'huile non traitée par le permanganate.

En terminant, citons l'observation suivante: le réactif est très soluble dans l'alcool éthylique. Cependant, l'addition de la solution alcoolique du réactif à une solu-

tion alcoolique d'hydroquinol ne donne aucune réaction violette.

Il semble néanmoins qu'en utilisant une solution de réactif dans l'alcool absolu, la solubilité réciproque d'une pareille solution et de l'huile de foie de morue devrait permettre à la réaction de se produire d'une façon plus intense et plus rapide qu'elle ne se produit avec des solutions aqueuses du réactif. Cependant, l'huile de foie de morue mélangée à une solution alcoolique du réactif à 15 % n'a donné ni immédiatement après agitation, ni après deux heures de repos, aucune réaction colorée, tandis que cette même huile donnait avec une solution aqueuse du réactif une réaction immédiate nette.

L'apparition des réactions colorées est manifestement liée à la réduction du complexe phospho-molybdo-tungstique, du moins en ce qui concerne l'apparition de la teinte violette. On voit que l'eau joue une part active dans ces réactions d'oxydo-réactions dans lesquelles l'acide phospho-molybdo-tungstique figure en tant que chromogène artificiel. Le rôle chimique actif de l'eau se dessine avec d'autant plus d'évidence que, dans ce cas, on ne peut pas, comme dans tant d'autres, expliquer l'influence de l'eau sur la marche d'oxydation par sa propriété dissolvante, l'alcool absolu étant, par rapport à l'huile de foie de morue, un solvant meilleur que l'eau.

La teneur en vitamine A et D et les réactions colorées des lipides autres que l'huile de foie de morue

On a soumis à l'épreuve au réactif B :

1° des corps gras éloignés autant que possible de l'huile de foie de morue, dont on savait qu'ils contenaient, comme cette dernière, de la vitamine D ;

2° des corps gras d'origine animale et végétale dans lesquels l'absence de la vitamine D a été démontrée.

Dans le premier cas, la réaction orange devait être positive, dans le deuxième cas négative. Le rapport entre l'intensité de la coloration orange obtenue dans le premier cas et celle de l'huile de fois de morue devait correspondre au rapport entre la richesse en vitamine D du corps éprouvé et celle de l'huile de fois de morue, établie par des expériences sur les animaux.

On a choisi, en tant que lipides connus par leur teneur en vitamine D, la fraction liposoluble du jaune d'œuf de poule et la graisse de beurre.

Trois jaunes d'œufs frais ont été mélangés à du benzène volume à volume. L'émulsion obtenue a été évaporée sous un ventilateur électrique. La pâte jaune-orange a été mise en tubes qui ont été placés au bain d'huile, chauffé à 115° C. Après quatre heures de chauffage et refroidissement consécutif, l'extrait benzoïque a donné à l'épreuve au réactif une coloration jaune-orange très vive.

La même réaction a été obtenue opérant avec de la poudre de jaunes d'œufs.

La troisième substance que nous avons choisie pour

contrôler la réaction était la graisse de beurre, dont la teneur en vitamines liposolubles est bien connue. On sait que les deux vitamines liposolubles présentes dans le beurre résistent mal à la conservation et au chauffage. Nous avons éprouvé 32 échantillons différents de beurre. L'extrait benzoïque, soumis à l'épreuve au réactif, était obtenu en extrayant 20 gr. de beurre avec 20 cm^3 de benzène. Quand la réaction était positive, on voyait, après addition du réactif (2 gouttes de réactif à 15 % sur 2 cm^3 d'extrait), la couche benzènique se colorer en rose.

Cette teinte s'observerait seulement dans les extraits obtenus des beurres, chauffés préalablement dans des tubes à 107° C. pendant une heure et demie, quatre heures et jusqu'à vingt heures. La réaction positive a été observée dans dix cas. La réaction la plus intense fut obtenue en opérant avec l'unique échantillon de beurre non commercial, reçu d'un fermier normand. En comparant l'intensité de la réaction que provoqua le beurre avec celle donnée par l'huile de foie de morue, on a pu constater qu'un gramme de ce beurre donnait une réaction 35 à 40 fois plus faible qu'un gramme d'huile de foie de morue fraîche. Et le beurre et l'huile de foie de morue, soumis à cette épreuve, ont été chauffés préalablement dans des tubes pendant quatre heures à 107° C. Les extraits benzoïques des échantillons de beurre, qui donnaient la réaction rose dans la couche benzènique, provoquaient aussi la réaction violette dans la couche inférieure aqueuse.

Le chauffage préalable des beurres diminuait l'intensité de cette réaction. Un beurre acheté dans une grande coopérative a fait exception à cette règle. Eprouvé tel

quel, il ne fit apparaître aucune réaction colorée. Cependant, soumis à quatre heures de chauffage, il provoqua une réaction rose nette dans la couche benzènique.

En présumant que la réaction rose est provoquée par la vitamine D et la réaction violette par la vitamine A, on comprendra que la vitamine D, étant plus stable, s'est conservée, tandis que la vitamine A a disparu.

Les beurres étalés sur du papier en couche mince et conservés pendant deux jours à la cave (12° C.) ne donnaient plus ni la réaction rose, ni la réaction violette.

Ainsi, nous voyons que trois substances: l'huile de foie de morue, le jaune d'œuf et le beurre, connues par leur richesse en vitamines liposolubles, donnent, après l'épreuve au réactif, une coloration jaune-orange ou rose se produisant dans la couche benzènique, et une réaction violette dans la couche aqueuse.

Nous avons, en outre, soumis à l'épreuve trois lipides qui, tous les trois, étaient considérés à l'époque comme étant dépourvus de vitamines liposolubles [BEZSSONOFF, 1924 (3) et 1925 (1)]. Ces lipides étaient deux huiles d'origine végétale: huile d'olive et huile d'arachide, et la graisse de viande fondue. Les trois substances éprouvées telles quelles ou après chauffage se montrèrent, à une exception près, incapables d'engendrer les colorations typiques. L'exception concernait l'huile d'olive qui, non chauffée, provoquait une réaction violette immédiate faible, mais suffisamment nette, qui apparaissait dans la couche aqueuse. D'après cette réaction, la vitamine A était donc présente dans l'huile d'olive.

Or, quand nous avons publié, en 1924, ces résultats, on considérait encore l'huile d'olive comme étant totalement privée de vitamine A. Cette opinion se basait sur

les conclusions de Mc Collum (1922), lesquelles d'ailleurs ne s'appuyaient à ce point sur aucune preuve expérimentale directe. En 1930, Magaillon démontra par épreuve sur rat que l'huile d'olive peut contenir une quantité encore notable de vitamine A. L'indication, fournie en 1924 par l'épreuve au réactif B, se trouva ainsi confirmée.

Sur la précision du test colorimétrique de la vitamine D

Citons maintenant deux exemples de la mesure de l'intensité de la coloration de la couche benzènique, obtenue en éprouvant le beurre du fermier.

Première épreuve. — Le beurre a été chauffé pendant quatre heures à 170° C.; l'extrait benzoïque (5 cm^3 de benzène sur 5 gr. de beurre) obtenu est décoloré par addition de charbon animal, l'extrait est laissé en contact avec ce dernier pendant trois heures et agité fréquemment et filtré ensuite sur un filtre en papier imbibé de benzène. Après addition de 5 cm^3 de benzène à 5 gr. de beurre et dissolution de la partie liposoluble du beurre, le volume de ce mélange était de 7 cm^3. Par conséquent, 1 cm^3 d'extrait correspondait à 0,714 gr. de beurreé prouvé. A 2 cm^3 d'extrait, on ajoute 10 gouttes de réactif à 15 %. La lecture a été faite 5 heures après l'addition du réactif. L'intensité de la coloration de Soudan-Braun de 3,31 mg. par litre d'eau.

Deuxième épreuve. — Le même beurre a été chauffé dans les mêmes conditions pendant 10 heures. L'intensité de la réaction égale 3,44 mg. de Soudan-Braun par litre d'eau. On en conclut que la prolongation du temps

de chauffage au-dessus de 4 heures n'augmentait plus l'intensité de la réaction. Prenant comme unité colorimétrique la teinte qui correspond à celle que donne 1 mg. de SOUDAN dissous dans un litre, on exprime l'intensité de la réaction que provoque la solution benzènique par 3,4 de ces unités. Cette solution contenait 0,71 gr. de beurre par 1 cm^3, par conséquent l'intensité de la réaction rapportée au gramme de beurre s'exprime par 4,8 unités.

On procéda parallèlement à l'épreuve de l'huile de foie de morue fraîche, chauffée pendant 30 heures, introduisant 5 cm^3 d'huile dans un becher de $33^m/_m$ de diamètre, qui permet encore de comparer la coloration obtenue après l'épreuve au réactif, avec une solution de SOUDAN (alcoolique). Prolongeant le chauffage, la coloration s'intensifie, mais change nettement de teinte. C'est le temps de chauffage limite de l'huile de foie de morue. La densité de l'huile prise pour ces épreuves était de 0,8753 à 20° C. L'addition de benzène n'avait pas d'influence sur le volume du mélange benzène-huile.

La lecture a été faite 6 heures après addition du réactif. La solution benzènique de l'huile, obtenue en ajoutant à un volume d'huile 6,5 volumes de benzène, a donné une coloration égale à 40 mg. de SOUDAN-BRAUN par litre d'alcool. L'huile ayant été diluée 7,5 fois, le nombre de 40 mg. doit être multiplié par autant pour obtenir la mesure de l'intensité de la coloration, rapportée à l'huile elle-même: $7,5 \times 40 = 300$ mg. de SOUDAN. Le rapport de l'intensité de la réaction provoquée par le beurre et l'huile de foie de morue se trouve donc être de $300 : 4,8 = 63$. Ce chiffre est au moins trois fois plus faible que celui qu'on obtient en comparant la teneur

en vitamine D des meilleurs échantillons de beurre à celle de l'huile de foie de morue, la comparaison étant basée sur les données fournies par épreuve sur rat. La mesure faite dans ces conditions est donc très approximative.

APPENDICE

SUR LES POSSIBILITES D'APPLIQUER LE REACTIF B A LA RECHERCHE DES BASES AZOTEES ET AU DOSAGE DE L'EAU LIBRE

LES BASES AZOTEES

Au chapitre I[er], nous avons indiqué que le réactif B précipite les bases azotées et décrit les composés complexes qu'il forme avec le sulfate d'ammoniaque. Nous avons pensé à utiliser cette propriété du réactif B en vue de préciser la nature de certains composés azotés qui apparaissent dans les urines. KATZ (1933) a, en effet, constaté que l'urine du nourrisson sain, déféquée à l'acétate de plomb en milieu acide, ne donne jamais de précipité après traitement au réactif B. Par contre, il observa fréquemment qu'il se produit un précipité parfois très abondant quand le réactif est introduit dans l'urine de certains nourrissons malades. Nos propres observations ont pleinement confirmé l'exactitude des données de KATZ. En outre, nous pûmes nous convaincre que la formation d'un tel précipité s'observe souvent dans l'urine d'un homme adulte en parfaite santé. Dans ce dernier cas, ce phénomène paraît dépendre de la composition du régime alimentaire. Les recherches que nous avons entreprises en collaboration avec MM. VALLETTE et ARC, dans le but de préciser la nature de ces préci-

pités, se trouvent encore à leur début. Aussi nous nous limiterons à signaler que, d'après leurs teneurs en azote et carbone, les précipités isolés de l'urine du nourrisson malade et de l'homme adulte sain sont nettement différents. D'autre part, nous pûmes constater que tous les précipités dissous dans l'alcali et distillés au microkjeldal cédaient une partie de l'azote qu'ils contenaient. La fraction restante de l'azote total ne se laissait distiller qu'après digestion du précipité dans SO_4H_2.

LE DOSAGE DE L'EAU LIBRE

Il est inutile d'insister sur le rôle exceptionnel que joue au sein des tissus vivants l'eau, en tant que solvant et catalyseur. Ce double rôle incombe en premier lieu aux molécules d'eau libre. La molécule $H^+ \ldots H^+$ étant un O^{--} dipole (NERNST, cité d'après HAISSINSKY, 1932), donc une molécule polarisée, possède la faculté d'entrer facilement en combinaisons, généralement instables, formant des complexes moléculaires ou, suivant la nouvelle terminologie, des composés complexes.

L'eau de cristallisation et l'eau fixée par l'alcool en offrent des exemples classiques. La fixation de l'eau par l'alcool éthylique a permis à NICLOUX (NICLOUX, 1934, NICLOUX et GOSSELIN, 1934, NICLOUX, 1934) d'établir un procédé ingénieux de dosage de l'eau libre dans les tissus et autres milieux biologiques.

Nous avons déjà mentionné aux chapitres I[er] et IV[e] que la présence de l'eau libre est nécessaire pour que se produisent les réactions colorées que provoque le réactif

B. En dissolvant simultanément le réactif et l'hydroquinol dans de l'alcool éthylique à 70°, on ne voit apparaître aucune réaction violette. Si l'on introduit de l'eau goutte à goutte dans cette solution, on verra, à un certain moment, apparaître la coloration violette. En mettant dans une cupule en porcelaine 2 cm^3 de la solution alcoolique contenant l'hydroquinol et le réactif B, on peut observer le virage au violet en ajoutant une goutte de 0,02 cm^3.

Nous n'indiquons là que le principe du procédé. Même élaboré et mis au point définitivement, il ne pourra jamais prétendre à toutes les applications que permet le procédé NICLOUX. Mais le dosage de l'eau libre étant un des problèmes les plus délicats, un moyen de contrôle supplémentaire pourrait en certaines occasions se révéler utile.

CONCLUSIONS

1° L'acide monomolybdo-phospho-tungstique isolé et décrit par nous en 1921 appartient à la série des acides molybdo-phospho-tungstiques dont l'existence fut révélée par Wu en 1920 et qui est caractérisé par le rapport:

$$\frac{Mo(n) + Tu(m), (m + n) = 18.}{P_2 O_5}$$

2° Le fait que l'acide monomolybdo-phospho-tungstique, que nous désignons le réactif B, ne contient qu'un atome de Mo, laisse prévoir sa faculté de provoquer des réactions colorées spécifiques.

3° Utilisé en milieu aqueux et acide, le réactif B provoque une réaction violette seulement en présence de composés qui possèdent une fonction diénolique.

4° Certains groupements d'atomes voisinant la fonction diénolique peuvent retarder l'apparition de la réaction violette qui ne se produit alors qu'en présence d'un grand excès de réactif et se trouve précédée d'une réaction jaune-brun très caractéristique. Une telle réaction se produit en présence du tanin (acide digallique) et de différents composés polyphénolés fréquents dans les milieux biologiques.

5° Mise en présence du réactif B, la vitamine C provoque uniquement une réaction violette.

6° Cette réaction de la vitamine C ne peut être considérée comme étant strictement spécifique. Elle s'adresse à une fonction déterminée et non à la molécule prise dans son ensemble.

7° En couplant l'épreuve au réactif B avec la détermination des potentiels d'oxydo-réduction du liquide éprouvé, il est possible d'identifier la vitamine C et de la doser avec sûreté.

8° Les réactions colorées qu'on observe en traitant avec une solution aqueuse du réactif B les solutions des lipides, possèdent une signification tout autre que celle des réactions qui se produisent en milieu entièrement aqueux.

9° La vitamine A, le carotène et le licopène, traités au réactif B, provoquent dans la couche aqueuse du mélange une coloration violette stable.

10° De même que tout autre test chimique ou physique, utilisé actuellement pour le dosage de la vitamine A, l'épreuve au réactif B ne peut être considérée comme étant strictement spécifique.

11° La nécessité de contrôler à l'aide du réactif B un dosage de la vitamine A, basé sur la réaction de CARR et PRICE, put être démontrée par expérimentation directe.

12° Des substances qui se forment par suite de l'oxydation de la vitamine D provoquent, en présence du réactif B, une coloration de la solution lipidique qui varie du rose au jaune-brun et se laisse difficilement mesurer. Cette réaction permet de se renseigner rapide-

ment sur la fraîcheur du beurre et de l'huile de foie de morue.

13° Le réactif B forme avec les sels des bases azotées, telle que l'ammoniaque et différents alcaloïdes, des composés complexes insolubles en solution acide, solubles dans l'alcali.

14° Quand le réactif est introduit en excès dans une solution de sulfate d'ammoniaque, il se forme un complexe insoluble de composition :

$$[SO_4(NH_4)H.]_4\ [MoO_3\ (TuO_3)_{17}P_2O_5]\ (H_2O)_{24}.$$

Quand on emploie une quantité de réactif inférieure à celle nécessaire pour assurer la formation d'un tel complexe, on obtient un autre complexe contenant une molécule de sulfate acide d'ammoniaque, de plus que le précédent.

BIBLIOGRAPHIE

ARNOLD (J.). — Fisheries Agricult. exper. in R. S. F. S. R., 1917-1927. — *Edition de l'Institut d'Agronomie expérimentale,* Leningrad, 1928.

BALL (E.) et CHEN (T.). — Potentiels de systèmes dont la forme oxydée se détruit. — *Congrès de Physiologie,* Rome, 1932.

BALL (E.) et CLARK (M.). — *Proc. Nat. Acad. Sc.,* 1931, 17, 347.

BERTRAND (G.) et DJORITCH (M^lle^ J.). — Sur un nouveau chromogène cristallisé, l'esculétol. — *C. R. Ac. Sc.,* 1924, 178, 1233.

BEZSSONOFF (N.). — La valeur antiscorbutique de la pomme de terre intacte et des produits obtenus par broyage. — *Bull. Soc. Hyg. Alim.,* 1920, 8, 10.

— (1) Du principe antiscorbutique dans le jus de pomme de terre extrait en présence d'acide. — *C. R. Ac. Sc.,* 1921, 173, 417.

— (2) Sur une réaction colorée commune aux extraits antiscorbutiques et à l'hydroquinol. — *C. R. Ac. Sc.,* 1921, 173, 466.

— (3) Influence des oxydases sur la destruction du principe antiscorbutique. — *Bull. Soc. Hyg. Alim.,* 1921, 9, 3.

— (1) Sur les réactions colorées des extraits antiscorbutiques et des polyphénols avec un acide phospho-molybdo-tungstique. — *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1922, 4, n° 2.

— (2) Effet sur cobayes d'une préparation antiscorbutique. — *C. R. Ac. Sc.,* 1922, 175, 890.

— (1) Sur une préparation antiscorbutique et sur le rôle de la vitamine A dans le scorbut expérimental. — *Bull. Soc. Hyg. Alim.,* 1923, 11, 37.

— (2) A simplified method of preparation of the Bezssonoff reagent for vitamin C and some polyphenols. — *Biochem. Journ.,* 1923, 17, n° 3.

— (1) Necessary conditions for testing with the reagent for vitamin C. — *Biochem. Journ.,* 1924, 18, 384.

— (2) Une condition complémentaire de l'épreuve au réactif de la vitamine C. — *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1924, 6, 288.

— Sur les réactions colorées des facteurs liposolublés. — *C. R. Ac. Sc.,* 1924, 179, 572.

— (1) Sur les réactions colorées des vitamines. — *Progrès de la Chimie biol.* (en russe), 1925, 2, 40.
— (2) Quelques données sur la nature du principe antiscorbutique. — *C. R. Ac. Sc.*, 1925, 180, 970.
— (1) Préparation rapide de l'acide phospho-molybdo-tungstique, réactif des polyphénols et des vitamines. — *C. R. Ac. Sc.*, 1926, 182, 1223.
— (2) L'effet antiscorbutique est-il dû à deux substances différentes ? — *C. R. Ac. Sc.*, 1926, 183, 1309.
— (1) Sur un nouveau régime antiscorbutique nettement spécifique. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, 9, 555.
— (2) L'effet antiscorbutique est-il dû à deux substances différentes ? — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, 9, 563.
— (1) Une méthode nouvelle pour caractériser l'action immédiate des vitamines hydrosolubles. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, 10, 1179.
— (2) Les effets immédiats de l'avitaminose C. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, 10, 1199.
— (1) Deux remarques au sujet des réactions colorées des vitamines. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, 11, 294.
— (2) Cobayes nourris à l'avoine irradiée avec et sans apport de vitamines A et C. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, 11, 1145.
— Vitamine A et carotène. — *C. R. Ac. Sc.*, 1930, 190, 529.
— Sur les préparations antiscorbutiques et la détermination de leur valeur biologique. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, 13, 950.
— Sur l'identification de la vitamine C. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, 16, 1108.
Bezssonoff (N.) et Delire (A.). — Sur les réactions colorées de la vitamine C. — *C. R. Ac. Sc.*, 1933, 196, 2036.
— Sur l'identification de la vitamine C et de ses dérivés. — *C. R. Ac. Sc.*, 1933, 197, 1774.
Bezssonoff (N.), Delire (A.) et Van Wien (H.). — L'activité réductrice de la vitamine C et d'autres réducteurs biologiques exprimée en fonction de leur concentration. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, 16, 1133.
Bezssonoff (N.) et Van Wien (H.). — (1) Sur les formes de l'acide ascorbique dans les sucs végétaux. — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 115, 1278.

— (2) Sur l'identification et le dosage de la vitamine C dans les milieux biologiques. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, 16, 1160.

BIRCH (T.) et DANN (V.). — Estimation and destribution of ascorbic acid and glutathion in animal tissues. — *Nature*, 1933, 131, 470.

BIRCH (T.) et HARRIS (L.). — Titration curve and dissociation constant of vitamin C. — *Biochem. Journ.*, 1933, 27, 595.

BIRCH (T.), HARRIS (L.) et RAY (S.). — A micro-chemical method for determination of the vitamin C. — *Biochem Journ.*, 1933, 27, 590.

Brevets allemands, 1926, 539, 174.

Brevets anglais, 1929, 313, 209.

Brevets français, 1928, 663, 866.

Brevets U. S., 1928, 1731, 081.

BRITTON (H.-T.) et GERMAN (W.-L.). — Physiochemical studies of complex acid. Molybdic Acid. — *Journ. Chem. Soc.*, 1930, 2, 2154.

CANEGALY (J.-R.). — Contribution à l'étude des régimes alimentaires. — *Thèse de doctorat en médecine*, Paris, 1924.

CHICK (M.-T.) et RHODES (M.). — *Lancet*, 1920, 2, 774.

CLARK (M.). — Studies on oxydation-reduction. — Washington, 1928. *Treasury Depart U. S. Publ. Health Service.*

CLOW (B.), MARLATT (A.-L.), PETERSON (W.) et MARTIN (E.-A.). — *Journ. Agr. Res.* (*U. S.*), 1929, 39, 963.

COWARD (K.), DYER (F.), MORTON (R.-A.) et GADDUM (J.-H.). — The determination of vitamin A in Cod liver oils, biologically, chemically, physically. — *Biochem. Journ.*, 1931, 25, 1102.

COX, HIRST (E.) et REYNOLDS (R.). — *Nature*, 1932, 130, 888 ; 1933, 131, 617. — *Chem. and Ind.*, 1933, 52, 482.

DANN (W.-J.). — Hexuronic (Ascorbic) Acid as the Antiscorbutic Factor., and its chemical Determination. — *Nature*, 1933, 131, 274.

— Carotène and Vitamin A of cow's colostrum. — *Biochem Journ.*, 1933, 27, 1998.

DAVEY (A.-G.). — Determination of the minimum doses of some citrus fruit juices which will protect a guinea-pig from scurvy, together with some observations on the preservation of such juices. — *Biochem. Journ.*, 1921, 15, 83.

DELF (E.-M.). — Effect of heat on the antiscorbutic accessory factor of vegetable and fruit juices. — *Biochem. Journ.*, 1920, 14, 11.

— Studies in Experimental Scurvy. — *Lancet*, 1922, 1, 576.

— The antiscorbutic value of fresh and canned Englisch tomatoes. — *Biochem. Journ.*, 1924, 18, 674.

— Influence of storage on the antiscurvy value of fruits and vegetables juices. — *Biochem. Journ.*, 1925, 19, 141.

DEMOLE (V.). — Vitamin C and Ascorbinsäure. — *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1933, 217, 83.

DICK (H.). — Weitere Beiträge zur Erforschung des reduzierenden Körpers im Zitronensaft. Dissertation. — Frankfurt a/M., 1932 (*Edition Kalbfleisch in Gelnhausen*).

DJORITCH (M^lle^ J.). — Le chromogène du marronnier d'Inde. — *Thèse de Paris*, 1924, édit. Picart.

DOMANSKA (Irène). — Les inconvénients de l'emploi du lait pasteurisé. — *Thèse de doctorat en médecine*, Strasbourg, 1933.

DRUMMOND (J.) et MORTON (R.-A.). — Observation on the assay of vitamin A. — *Biochem. Journ.*, 1929, 23, 785.

EULER (H. DE). — Carotène et vitamine A. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, 14, 838.

EULER (H. DE) et KLUSSMANN (S.). — Zur Biochemie der Carotinoide und des Vitamins C. — *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1933, 219, 215.

EULER (H. DE) et MARTIUS (C.). — Ueber Redukton und Ascorbinsäure. — *Liebig's Ann. d. Chemie*, 1933, 505, 73.

FOLIN et DENIS. — *Journ. Biol. Chem.*, 1912, 12, 239 ; 1915, 22, 305.

FRANK (A.). — Ueber den Wert der Bezssonoff'schen Farbereaktion auf Vitamin C. — *Jahrb. f. Kinderhlk.*, 1925, 109, 3 F, 59, 87.

FREUDENBERG (K.). — *Ber. d. deutsch. Chem. Ges.*, 1923, 56, 1189.

GASPAR (G.) et ARNAL (T.). — Notes sur molybdates, tungstates et phosphotungstates. — *Ann. Chim. Anal. et chim. appl.*, 1929, 11, 97.

GEORGESCU (J.-D.). — *Journ. de Chim. phys.*, 1932, 29, 217.

GILLAM (A.) et MORTON (R.-A.). — The antimony trichloride colour test and the ultraviolet absorption. — *Biochem. Journ.*, 1931, 25, 1346.

GLASSMANN (B.) et POSDEEW (A.). — Ueber den chemischen Nachweis des Vitamins C. — *Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm.*, 1929, 57, 191.

GORTNER et HOLM. — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1920, 12, 1678.

HAWORTH et HIRST. — *Journ. Chem. Soc.*, London, 1933, 1270.

HAHN (F.). — *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 1926, 1300.

— Vitaminstudien. — *Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm.*, 1930, 59, 4, 18 ; 1931, 61, 369.

HAHN (F.) et WIEBEN (M.). — Chemische Methoden der Vitaminbestimmung. I. Die Bezssonoff'sche Reaktion. — *Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm.*, 1932, 63, 481.

HAISSINSKY (M.). — L'atomistique moderne et la chimie. — *G. Doin et C^ie, éditeurs*, Paris, 1932.

HARRIS (L.-J.), RAY (S.-N.) et WARD (A.). — The excretion of vitamin C in human urine and its dependence of the dietary intake. — *Biochem. Journ.*, 1933, 27, 2011.

HARRISON (D.-C.). — Vitamine C action on oxidation of tissues in vitro. — *Biochem. Journ.*, 1933, 27, 1501.

HEILBRONN (J.), GILLAM (A.) et MORTON (R.-A.). — Specificity intest for vitamin A. — *Biochem. Journ.*, 1931, 25, 1352.

HIRST. — *Journ. Chem. Soc.*, London, 1932, 128.

HIRST (E.-L.), PERCIVAL (E.-G.) et SMITH (F.). — Constitution of Ascorbic Acid. — *Nature*, 1933, 131, 617.

JVANOFF (N.), BOUKINE (W.), etc... — *Travaux de botanique appliquée*. Série A, n° 8, p. 95, 1933. Leningrad (Russie).

KARRER (P.), SALOMON (H.) et SCHOPP (K.). — Constitution of Dehydro-Ascorbic Acid. — *Nature*, 1933, 131, 300.

KATZ (A.). — Le dépistage du scorbut latent. — *Thèse de doctorat en médecine*, Strasbourg, 1933.

KAY (H.-D.) et ZILVA (S.-S.). — The alleged specific colour reaction for the antiscorbutic factor. — *Biochem. Journ.*, 1923, 17, 872.

KOOPMANN (G.). — Ueber Vitamin C. — *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1924, 37, 68.

KOSSEL (W.) — *Valenzkräfte und Rötgenspektren*, Berlin, 1924.

KRUMHOLZ. — Kolorimetrische Studien von Heteromolybdaten. — *Zeitschr. f. Anorg. allgem. Chem.*, 1933, 91, 212.

LAKI (K.). — *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1933, 217, 54.

LANGENBECK (W.). — *Bioch. Handlexikon,* 1924. Verlag Julius Springer, Berlin. B. II (4. Ergänzung) S. 469.

LEVIN. — *Journ. Amer. Chem. Soc.,* 1920, 11, 612.

LŒWY (E.). — Erfahrungen mit dem Bezssonoff Reagens (B. R.) auf Vitamin C. — *Münch. Mediz. Wochenschr.,* 1925, 72, 1780.

LOVERN (J.), CREED (R.) et MORTON (R.-A.). — The Mittelmann process for treating Fish-livers. — *Biochem. Journ.,* 1931, 25, 1341.

MALAPRADE (L.). — *Ann. Chim.,* 1929, (10), 11, 159.

MARGAILLON (L.). — Les vitamines et le raffinage des huiles d'olives. — *C. R. Ac. Sc.,* 1930, 191, 725.

MARSAIS (P.) et GAVOTY (B.). — Stérilisation des liquides fermentescibles par le procédé Matzka. — *Bull. Soc. Encouragement pour l'Industrie Nationale,* décembre 1932.

MERJANIAN (A.). — Ueber den Vitamingehalt von Trauben und Traubenweinen. — *Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm.,* 1926, 52, 307.

MICHAELIS (L.). — Oxydations-Reduktions-Potentiale. — Berlin, 1929, Springer.

MICHEEL (F.). — Ueber das Vitamin C. — *Angewandte Chemie,* 1933, 46, 533.

MICHEEL (F.) et JUNG (F.). — Vorläufige Mitteilung. — *Ber. D. Chem. Ges.,* 1933, 66, 1231.

MICHEEL (F.) et KRAFT (K.). — Die Konstitution des Vitamins C. — *Zeitschr. f. physiol. Chem.,* 1933, 215, 215, 216, 234, 218, 280, 222, 239.

MICHEEL (F.) et MOLL (T.). — Zur Frage der Identität von Ascorbinsäure und Vitamin C. — *Zeitschr. f. physiol. Chem.,* 1933, 219, 293.

MITTELMANN (S.). — Les graisses de la morue et nouvelles méthodes de leur préparation. — *Nouvelles de l'Inst. Agronom. Expérim.,* 1925, n° 1, p. 3. Leningrad.

— The manufacturing of fish conserves of Murman. — *Transact. Inst. for Explor. of the North.* Leningrad, 1927, 38.

MOOR (T.). — Vitamin A and Carotene. — *Biochem Journ.,* 1929, 23, 1268.

MORLEY (A.-M.). — The structure of the Tungstic Acids. — *Journ. Chem. Soc.,* 1930, 2, 1987.

NICLOUX (M.). — (1) Diffusion de l'alcool éthylique dans les tissus chez le poisson. Différenciation par son imperméabilité à l'alcool d'une eau liée aux protéides. — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 115, 1284.

— (2) Mesure d'une eau liée aux protéides imperméable à l'alcool ; ses variations dans certaines conditions expérimentales. — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 115, 1287.

— (3) Hypothèse sur la pénétration de l'alcool dans les tissus de l'organisme : l'eau facteur prépondérant. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, 16, 330.

NICLOUX (M.) et GOSSELIN (G.). — Diffusion de l'alcool éthylique : *a*) in vitro ; *b*) in vivo ; rôle de l'eau des tissus. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, 16, 338.

NORDMANN (J.) et VAN WIEN (H.). — Déterminations précises de la teneur en vitamine C du cristallin normal et caracté. — *Bull. Soc. Ophtalm.*, Paris, 1934, 136.

ORLOW (N.-L.). — Farbenreaktionen d. Vitamin A. — *Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm.*, 1930, 60, 254.

PARSON et HORN. — *Journ.A gr. Research.*, 1932, 47, 627.

PAULING (L.). — The molecular structure of the tungstosilicates. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1929, 51, 2868.

RABE (P.), WENK (B.) et HARTMANN (E.). — Complex compound Tu, Mo. — (*Voir brevets.*)

RANDOIN (M^me^ L.). — A propos d'une conférence internationale sur l'étalonnage des vitamines, organisée par la Soc. Nat., Londres (juin 1931). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, 13, 1278.

— Le standard et l'unité internationale de la vitamine A. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, 15, 637.

— Sur le degré de l'activité antiscorbutique de l'acide ascorbique. — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 116, 4.

RANDOIN (M^me^ L.) et NETTER (B.). — La nature chimique de la vitamine C. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, 15, 275.

REICHSTEIN (T.). — *Helv. Chem. Acta*, 1933, 16, 1020.

REICHSTEIN (T.) et GRUSSNER (A.). — *Helv. Chem. Acta*, 1933, 16, 561.

REICHSTEIN (T.), GRUSSNER (A.) et OPPENAUER (R.). — Synthesis of *d* and *l* Ascorbic Acid (Vitamin C). — *Nature*, 1933, 132, 280.

REIF (G.). — Ueber eine neuartige Anwendung der Phosphor-Wolfram- und Phosphormolybdansäure zur Bestimmung der Harnsäure in Milch und Blut. — *Biochem. Zeitschr.*, 1925, 161, 128.

REMY (E.) et RICHTER (F.). — Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung badischer Weine des Jahrganges 1928 unter besonderer Berücksichtigung des Arsengehaltes sowie der Brauchbarkeit des C. Vitamins. — *Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm.*, 1929, 58, 624.

ROSENHEIM (A.) et WOLFF (A.). — *Zeitschr. anorg. allg. Chem.*, 1930, 193, 47, 64.

SCHLEMMER (F.), BLEYER (R.) et CAHNMANN. — Die Beziehung zwischen dem Reduktionsvermögen der Milch und ihrem Gehalt an Vitamin C. — *Bioch. Zeitschr.*, 1932, 254, 187.

SCHEUNERT (A.) et RESCHKE (J.). — Ueber den angeblichen Vitamin C Gehalt des Kaffees. — *Klinisch. Wochenschr.*, 1931, 10. Juli, 1452.

SCHWARZ (B.) et GIESE (H.). — *Ber. D. Chem. Ges.*, 1930, 63, 2428.

SIEBERT (F.). — Ueber den reduzierenden Stoff in pflanzlichen Lebensmitteln. — *Dissertation*, Frankfurt a/M., 1931. (Imprimé par Kalbfleisch-Gelmhausen.)

SZENT-GYORGYI (A.). — Hexuronic Acid as the antiscorbutic Factor. — *Nature*, 1932, 129, 943. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, 15, 694.

THOMAS (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1921, 3, 137.

TILLMANS (J.). — Das antiskorbutische Vitamin. — *Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm.*, 1930, 60, 34.

— Ueber das Wesen des C-Vitamins. — *Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm.*, 1932, 64, 11.

TILLMANS (J.), HIRSCH (P.) et HIRSCH (W.). — Der reduzierende Stoff des Zitronensaftes. — *Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm.*, 1932, 63, 1.

TILLMANS (J.), HIRSCH (P.) et JACKISCH (G.). — Das Reduktionsvermögen pflanzlicher Lebensmittel und seine Beziehung zum Vitamin C. — *Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm.*, 1932, 63, 16.

TILLMANS (J.), HIRSCH (P.) et VAUBEL (R.). — Das Reduktionsvermögen pflanzlicher Lebensmittel und seine Beziehung zum Vitamin C. — *Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm.*, 1933, 65, 145.

VAN EECKELIN (M.), EMMERIC (A.), JOSEPHY (B.) et WOLF (L.). — Vitamin C in Körperflüssigkeiten. — *Klin. Wochenschr.*, 1934, 13, 564.

VAN STOLK (M^lle M.-M.), GUILBERT (J.), PENAU (H.) et SIMONNET (H.). — Carotène pur et Vitamine A. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, 13, 616.

WALDMANN (A.). — The physiological exchange by birds. — *Memoirs of the Institute for dary and vegetable gardening of Leningrad*, 1931, 1, 73.

WALDMANN (A.) et KRJICHKOVSKY (K.). — Sur la synthèse de la vitamine C. — *Physiology of Poultry*, 1934, 1, 5 (Moscou).

WEDGEWOOD (P.-E.) et FORD (M^lle F.). — Sur la valeur de la réaction de Bezssonoff comme indicateur de la présence de la vitamine C dans le jus de choucroute. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, 6, 217.

WU. — *Journ. Biol. Chem.*, 1920, 43, 183.

WURMSER (R.). — Oxydations et Réductions. — Paris, 1930 (*Presses Universitaires*).

WURMSER (R.) et DE LUREIRO (G.). — Le potentiel d'oxydo-réduction de l'acide ascorbique. — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 113, 543.

ZACH (Cl.). — *Mitteil. a. d. Gebiet d. Lebensm. Unters.*, 1928, B. 19, H. 1, 561.

ZILVA (S.). — Conditions of inactivation of the accessory food factors. — *Biochem. Journ.*, 1922, 16, 42.

— Influence of reaction on the oxydation of the antiscorbutic factor in lemon juice. — *Biochem. Journ.*, 1923, 17, 416.

— The antiscorbutic fraction of lemon juice. — *Biochem. Journ.*, 1927, 21, 189.

— The non-specificity of the phenol-indophenol reducing capacity of lemon juice and its fractions as a mesure of their antiscorbutic activity. — *Biochem. Journ.*, 1932, 26, 1624.

— Indophenol reducing capacity of lemon juice. — *Nature*, 1933, 131, 363.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 5

Chapitre I

LES PRINCIPAUX CARACTÈRES DE L'ACIDE MONOMOLYBDO-PHOSPHO-TUNGSTIQUE

Son obtention et sa composition élémentaire 13
Solubilité et propriétés acides 17
La formation des composés complexes 18
Le potentiel des solutions du réactif B (l'acide monomolybdo-phospho-tungstique) et du dichlorphénol-indophénol 26
Les réactions colorées de l'acide monomolybdo-phospho-tungstique (le réactif B) en milieu aqueux et acide 27
La spécificité de la réaction diénolique type 35

Chapitre II

LES DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT L'ÉPREUVE AU RÉACTIF B DES PRODUITS ANTISCORBUTIQUES

Résumé des travaux de différents auteurs consacrés à ce sujet 40
Analyse des données parues dans la littérature 76

Chapitre III

L'IDENTIFICATION ET LE DOSAGE DE LA VITAMINE C PAR L'ACIDE MONOMOLYBDO-PHOSPHO-TUNGSTIQUE

Remarques générales concernant les réactions colorées des vitamines 88

La spécificité de la réaction violette par rapport à la vitamine C 92

Application du réactif B au dosage du réducteur diénolique

Principe de la méthode 97
Causes d'erreur 98
Solutions nécessaires 99
Préparation des liquides à analyser 101
L'épreuve colorimétrique 102
La détermination du pouvoir réducteur 108
Les déterminations du potentiel 114
Les possibilités d'un dosage spectro-photométrique de la vitamine C 115

Détermination de la teneur en vitamine C des végétaux

Le jus de citron 116
Le suc de chou 117
Le suc de tomate 118
Le suc de tomate conservé 119

La teneur en vitamine C du jus de choucroute fraîchement extrait 120

Détermination du réducteur diénolique dans les urines, le lait et le cristallin

Les urines 125
Le rapport du diénol excrété dans l'urine à la vitamine C absorbée dans la nourriture 129

Le lait 130
Le cristallin 133
Sommaire 134

Chapitre IV

LES RÉACTIONS COLORÉES DES LIPIDES TRAITÉS AU RÉACTIF B. — Généralités 136

Les réactions colorées et le spectre d'absorption de la vitamine A 138
L'intensité de la réaction violette d'une molécule d'hydroquinol, de carotène et de vitamine A 148

Epreuve de carotène 149
Epreuve de la vitamine A 150
Sur la précision et la spécificité des épreuves au réactif Carr et Price et B 153

Les réactions colorées qui caractérisent la destruction de la vitamine D 155

La mesure de l'intensité des colorations qui apparaissent dans la couche benzènique 156

Epreuve au réactif B de l'huile de foie de morue
L'influence d'un chauffage préalable de l'huile sur les réactions qu'elle provoque 158

L'influence du chauffage sur les réactions colorées de l'huile de foie de morue est due à une oxydation 163

Réaction de la couche benzènique 164
La teneur en vitamine A et D et les réactions colorées des lipides autres que l'huile de foie de morue 172

Sur la précision du test colorimétrique de la vitamine D 175

Appendice

SUR LES POSSIBILITÉS D'APPLIQUER LE RÉACTIF B A LA RECHERCHE DES BASES AZOTÉES ET AU DOSAGE DE L'EAU LIBRE

Les bases azotées 178
Le dosage de l'eau libre 179

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 181

BIBLIOGRAPHIE 184

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté:

1° **L'acide nucléique dans les relations du noyau et du cytoplasme.**

2° **Le flavone et ses dérivés.**

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 28 juillet 1934.

LE DOYEN DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,

E. ROTHE.

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 1er août 1934.

LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE,

J. DRESCH.